

ROBERSON DIBAX

**REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE (*Eucalyptus camaldulensis*) DEHN.
A PARTIR DAS FOLHAS COTILEDONARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marguerite G. G. Quoirin
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Francine L. Cuquel
Co-orientador: Prof. Dr. Henrique S. Koehler

CURITIBA

2004



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

P A R E C E R

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pelo candidato **ROBERSON DIBAX**, sob o título **“REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE *Eucalyptus camaldulensis* DEHN. A PARTIR DE FOLHAS COTILEDONARES”**, para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato são de parecer pela **"APROVAÇÃO"** da Dissertação.

Curitiba, 19 de Fevereiro de 2004.

Professor Dr. Enio Pedrotti
Primeiro Examinador

Professor Dr. Fernando Grossi
Segundo Examinador

Professora Dra. Francine Lorena Cuquel
Terceira Examinadora

Professora Dra. Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin
Presidente da Banca e Orientadora

Á minha mãe Rosália,
que também sonhou muito com cada página aqui presente,

Dedico

Poesia Mínima

Pintou estrelas no muro
e teve o céu ao alcance das mãos.

Helena Kolody

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal da Universidade Federal do Paraná, especialmente ao coordenador Prof. Dr. Luiz Antônio Biasi.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante o período desta pesquisa.

A Profa. Dra. Marguerite Quoirin, pela dedicada orientação, amizade e incentivo.

A Profa. Dra. Francine Lorena Cuquel, pela co-orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Henrique Koehler pela orientação estatística.

Ao Prof. Dr. Valdo José Cavallet pela amizade e incentivos prestados desde a época da graduação.

Ao laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, especialmente à Profa. Dra. Cleusa Bona pela orientação no estudo histológico.

Ao Instituto Ambiental do Paraná e ao Instituto de Pesquisas Florestais pela disponibilização das sementes utilizadas nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fernando Grossi do Departamento de Ciências Florestais da UFPR, pelas informações prestadas sobre o desenvolvimento *in vitro* de *Eucalyptus*.

Ao Prof. Dr. Enio Pedrotti (UFSC) e ao Prof. Dr. Gilmar Zaffari (EPAGRI – Itajaí) pelas excelentes contribuições para a finalização deste estudo.

Aos meus estagiários André Rosseto, Oscar A. Risch e Cristiane Eisfeld, que em diferentes épocas desta pesquisa me prestaram grande auxílio.

Às secretárias da PGAPV Lucimara Antunes e Maria de Lourdes da Silva Wos (Lurdinha).

Aos colegas de Pós-Graduação: Alexandre Drefahl, Alessandro Dronk, Sandra Cabel, Regina Quisen, Lizane de Souza e Justina Anselmini pela amizade, descontração e ajuda mútua prestada.

À técnica do laboratório, Célia Calmo da Silva.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio, compreensão e incentivo durante o desenvolvimento deste estudo.

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
	LISTA DE TABELAS.....	xii
	LISTA DE FIGURAS.....	xiv
	RESUMO.....	xvii
	ABSTRACT.....	xviii
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
	2.1 Gênero <i>Eucalyptus</i>	3
	2.2 <i>Eucalyptus camaldulensis</i> DEHN.....	5
	2.2.1 Características morfológicas.....	5
	2.2.2 Ocorrência e exigências edafoclimáticas.....	5
	2.2.3 Importância econômica e silvicultural.....	5
	2.3 Regeneração <i>in vitro</i>	6
	2.4 A cultura <i>in vitro</i> do <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	7
	2.4.1 Desinfestação das sementes de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> para o cultivo <i>in vitro</i>	7
	2.4.2 Meios de cultura.....	7
	2.4.2.1 Meios de cultura para a germinação <i>in vitro</i> das sementes de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	8
	2.4.2.2 Meios de cultura para indução de calos e gemas em <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	8
	2.4.2.3 Meios de cultura para enraizamento dos brotos (micro- estacas) de <i>Eucalyptus</i>	9
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
	3.1 Local de realização dos experimentos.....	11
	3.2 Condições de cultura <i>in vitro</i>	11

3.3	Obtenção de plantas de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> para utilização nos ensaios <i>in vitro</i>	11
3.3.1	Experimento de desinfestação das sementes.....	11
3.4	Testes de indução de calos e gemas a partir das folhas cotiledonares de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	12
3.4.1	Meio de cultura de base.....	12
3.4.2	Material vegetal.....	13
3.4.3	Efeito da combinação de ANA e BAP na calogênese e regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	13
3.4.4	Efeito da ausência de luz na indução de calos e gemas a partir das folhas cotiledonares de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	14
3.4.5	Efeito das modificações do meio de cultura MS na regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	14
3.4.6	Efeito do tempo de permanência dos explantes em meio de cultura MS na regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	15
3.5	Avaliação dos experimentos.....	16
3.6	Análise estatística.....	16
3.7	Testes de alongamento e enraizamento das gemas.....	16
3.8	Estudo histológico dos explantes em fase regenerativa.....	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1	Experimento de desinfestação das sementes de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	19
4.2	Experimentos de indução de calos e gemas a partir das folhas cotiledonares de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	23
4.2.1	Efeito de combinações de ANA e BAP na calogênese e regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	23
4.2.2	Efeito da ausência de luz na calogênese e regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	37
4.2.3	Efeito das modificações do meio de cultura MS na calogênese e regeneração a partir das folhas cotiledonares de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	46

4.2.4	Efeito do tempo de permanência dos explantes em meio de cultura MS na calogênese e regeneração a partir das folhas cotiledonares de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	48
4.3	Testes de alongamento e enraizamento.....	50
4.4	Estudo histológico dos explantes em fase regenerativa.....	52
4.5	Protocolo de regeneração de plantas de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> a partir das folhas cotiledonares definido nesta pesquisa:.....	56
5	CONCLUSÕES	57
6	REFERÊNCIAS	59

LISTA DE ABREVIATURAS

1/2 MS - meio de cultura (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com a concentração de sais reduzida à metade.

2,4 - D - ácido 2,4 - diclorofenoxiacético

4-CPPU - N-(2-cloro-4-piridil)-N-feniluréia

AIA - ácido indolacético

AIB - ácido indolbutírico

ANA - ácido naftalenoacético

BAP - 6 - benzilaminopurina

FAA - solução de formol + ácido acético + etanol

GA₃ - ácido giberélico (2,4^a, 7-trihidroxi-1metil-8metileno-gib-3ene-1,10-ácido carboxílico-1,4-lactona)

MS - meio de cultura (MURASHIGE e SKOOG, 1962)

P.A - para análise

TDZ - tidiazuron (1-fenil-3-(1,2,3-tiadizol-5-il) uréia)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resultados da análise de variância para a porcentagem de germinação e de contaminação de sementes de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> em função das concentrações de hipoclorito de sódio e do pré-tratamento com etanol 70%.....	19
TABELA 2 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias de germinação de sementes de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> em função das concentrações de hipoclorito de sódio e o pré-tratamento com etanol 70%.....	20
TABELA 3 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias de sementes de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> contaminadas em função das concentrações de hipoclorito de sódio e do pré-tratamento com etanol 70%.....	21
TABELA 4 - Resultados da análise de variância para a porcentagem de explantes formando calos, porcentagem de explantes regenerando gemas, número de gemas por explante e porcentagem de explantes mortos em <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	24
TABELA 5 - Resultados do teste de Tukey para comparação das médias das porcentagem de explantes de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> com calos em função das concentrações de ANA e BAP comparadas.....	24
TABELA 6 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias das porcentagens de explantes de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> regenerando gemas em função das concentrações de ANA.....	28
TABELA 7 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias das porcentagens de explantes de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> regenerando gemas em função das concentrações de BAP.....	28
TABELA 8 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias dos números de gemas por explante de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> , em função das concentrações de ANA.....	31
TABELA 9 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias dos números de gemas por explante de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> , em função das concentrações de BAP.....	31
TABELA 10 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias das porcentagens de explantes de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> mortos em função das concentrações de ANA e BAP.....	34
TABELA 11 - Resultados da análise de variância para a percentagem de explantes formando calos, porcentagem de explantes regenerando gemas, número de	

gemas por explante e percentagem de explantes mortos em <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	37
TABELA 12 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias entre os níveis de ANA combinados com 4,44 µM de BAP e a condição de cultivo nos primeiros 30 dias para a percentagem de explantes com calos.....	38
TABELA 13 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias entre os níveis de ANA combinados com 4,44 µM de BAP para a percentagem de explantes regenerando gemas.....	40
TABELA 14 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias entre as condições de cultura para percentagem de explantes regenerando gemas.....	40
TABELA 15 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias do número de gemas por explante em função dos níveis de ANA combinado com 4,44 µM de BAP.....	42
TABELA 16 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias do número de gemas por explante em função das condições de cultivo.....	42
TABELA 17 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias das percentagens de explantes mortos em função das concentrações de ANA e condições de cultivo.....	44
TABELA 18 - Resultados da análise de variância para a percentagem de explantes formando calos, percentagem de explantes regenerando gemas, número de gemas por explante e percentagem de explantes mortos em <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	46
TABELA 19 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias das variáveis percentagem de folhas cotiledonares com calos, percentagem de explantes regenerando gemas, número de gemas por explante e percentagem de explantes mortos em <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	46
TABELA 20 - Resultados da análise de variância para a percentagem de explantes formando calos, percentagem de explantes regenerando gemas, número de gemas por explante e percentagem de explantes mortos em <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	48
TABELA 21 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias das variáveis percentagem de explantes com calos, percentagem de explantes regenerando gemas, número de gemas por explante e percentagem de explantes mortos em <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Obtenção das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*. (A) Sementes de diferentes cores e tamanhos. Barra = 2 mm. (B) Sementes selecionadas mediante utilização de peneira. Barra = 2 mm. (C) Plântula germinada *in vitro* com 15 dias de idade. Barra = 7 mm. (D) Folhas cotiledonares cortadas na base do pecíolo, (ab) abaxial e (ad) adaxial. Barra = 2 mm.....13
- Figura 2 – Equação de regressão ajustada para o efeito das concentrações de hipoclorito de sódio (HClO) sem o pré-tratamento com etanol 70% na germinação das sementes de *Eucalyptus camaldulensis*.....21
- Figura 3 – Equação de regressão ajustada para o efeito das concentrações de hipoclorito de sódio (HClO) sem o pré-tratamento com etanol 70% na contaminação das sementes de *Eucalyptus camaldulensis*.....22
- Figura 4 – Equação de regressão ajustada para o efeito das concentrações de hipoclorito de sódio (HClO) com o pré-tratamento com etanol 70% na germinação das sementes de *Eucalyptus camaldulensis*.....22
- Figura 5 – Equação de regressão ajustada para o efeito das concentrações de hipoclorito de sódio (HClO) com o pré-tratamento com etanol 70% na contaminação das sementes de *Eucalyptus camaldulensis*.....23
- Figura 6 – Equação de regressão ajustada para porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* com calos em função das três concentrações de BAP quando o ANA não foi adicionado.....26
- Figura 7 – Equação de regressão ajustada para porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* com calos em função das três concentrações de BAP quando 2,7 μ M de ANA foi adicionado aos meios de cultura.....26
- Figura 8 – Equação de regressão ajustada para porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* com calos em função das três concentrações de BAP quando 5,4 μ M de ANA foi adicionado aos meios de cultura.....27
- Figura 9 – Equação de regressão ajustada para porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* regenerando gemas em função das três concentrações de BAP na ausência de ANA.....28
- Figura 10 – Equação de regressão ajustada para porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* regenerando gemas em função das três concentrações de BAP e 2,7 μ M de ANA.....29
- Figura 11 – Equação de regressão ajustada para porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* regenerando gemas em função das três concentrações de BAP e 5,4 μ M de ANA.....29

- Figura 12 –Efeito de combinações de ANA e BAP sobre a calogênese. (A) Folha cotiledonar iniciando calogênese 15 dias após a inoculação em meio de cultura MS contendo 2,7 μ M de ANA + 13,32 μ M de BAP (tratamento 6). Barra = 1,25 mm (B) calos verdes recobrimdo o explante 30 dias após inoculação em meio de cultura MS contendo 5,4 μ M de ANA + 4,44 μ M de BAP (tratamento 8). Barra = 2,0 mm (C) Calos verdes formados na base do pecíolo 30 dias após a inoculação em meio MS contendo 2,7 μ M de ANA + 13,32 μ M de BAP (tratamento 6). Barra = 1,70 mm.....30
- Figura 13 –Efeito de combinações de ANA e BAP na regeneração de gemas em folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*. (A) explante regenerando gemas 30 dias após a inoculação em meio de cultura MS contendo 2,7 μ M de ANA (tratamento 2). Barra = 2,3 mm. (B) base do pecíolo iniciando regeneração de gemas 15 dias pós a inoculação em meio MS contendo 5,4 μ M de ANA + 4,44 μ M de BAP (tratamento 8). Barra = 1,25mm. (C) Tufo de gemas recobrimdo o explante 60 dias após a inoculação em meio MS contendo 2,7 μ M de ANA + 4,44 μ M de BAP (tratamento 5). Barra = 2,2 mm.....30
- Figura 14 –Equação de regressão ajustada para o número de gemas por explante de *Eucalyptus camaldulensis* em função das três concentrações de BAP na ausência de ANA.....32
- Figura 15 –Equação de regressão ajustada para o número de gemas por explante de *Eucalyptus camaldulensis* em função das três concentrações de BAP para 2,7 μ M de ANA.....32
- Figura 16 –Equação de regressão ajustada para o número de gemas por explante de *Eucalyptus camaldulensis* em função das três concentrações de BAP para 5,4 μ M de ANA.....33
- Figura 17 –Equação de regressão ajustada para o efeito das três concentrações de BAP na ausência de ANA na porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* mortos.....35
- Figura 18 –Equação de regressão ajustada para o efeito das três concentrações de BAP quando 2,7 μ M de ANA foi adicionado aos meios de cultura para a porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* mortos.....36
- Figura 19 – Equação de regressão ajustada para o efeito das três concentrações de BAP e 5,4 μ M de ANA na porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* mortos.....36
- Figura 20 –Equação de regressão ajustada para a variável porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* com calos em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram na presença de luz durante 60 dias.....39
- Figura 21 –Equação de regressão ajustada para a variável porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* com calos em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram os 30 primeiros dias de cultivo no escuro.....39
- Figura 22 –Equação de regressão ajustada para a variável porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* regenerando gemas em função das três

concentrações de ANA quando os explantes permaneceram os 60 dias de cultivo na presença de luz.....	41
Figura 23 –Equação de regressão ajustada para a variável porcentagem de explantes de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> com gemas em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram os 30 primeiros dias de cultivo no escuro.....	41
Figura 24 –Equação de regressão ajustada para a variável número de gemas de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> por explante em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram os 60 dias de cultivo na presença de luz.....	43
Figura 25 –Equação de regressão ajustada para a variável número de gemas de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> por explante em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram os 30 primeiros dias de cultivo no escuro.....	43
Figura 26 –Equação de regressão ajustada para a variável porcentagem de explantes de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> mortos em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram os 60 dias de cultivo na presença de luz.....	45
Figura 27 –Equação de regressão ajustada para a variável porcentagem de explantes de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> mortos em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram os 30 primeiros dias de cultivo no escuro.....	45
Figura 28 –Efeito do escuro na calogênese em folhas cotiledonares de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> . (A) e (B) Calos brancos formados no limbo foliar e base do pecíolo 30 dias após a inoculação em meio de cultura MS com 2,7 μ M de ANA + 4,44 μ M de BAP. Barra, 2,5 mm.....	51
Figura 29 –Indução de alongamento em gemas de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> provenientes do meio de cultura MS contendo 2,7 μ M ANA e 4,44 μ M BAP. (A) Alongamento após 30 dias na presença do meio de cultura MS completo sem carvão ativado. (B) Alongamento após 30 dias na presença do meio de cultura MS com a concentração de nitratos reduzida a metade e 2% de carvão ativado. Barra = 8 mm.....	51
Figura 30 –Estágios sucessivos da calogênese em folhas cotiledonares de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> em secções transversais (A) (controle). (B) Célula do parênquima lacunoso contendo compostos fenólicos. (C-F) Diferentes estágios do desenvolvimento dos calos em folhas cotiledonares tratadas com fitorreguladores. (ad) face adaxial, (ab) face abaxial, (ppc) parênquima paliçádico clorofiliano, (pl) parênquima lacunoso, (□) célula contendo compostos fenólicos, (seta) núcleo meristemático, (c) calo, (fv) feixe vascular. Barra = 100 μ m.....	54
Figura 31 –Estágios sucessivos da organogênese em folhas cotiledonares de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> seccionados transversalmente. (A) Início da formação de um ápice meristemático caulinar. (B) Gema em vista longitudinal. (g). (C) Detalhe da figura (B). Gema em vista longitudinal. (E) Gema caulinar evidenciando conexão com o tecido do calo. (F) Gemas caulinares em estágio avançado de desenvolvimento e procâmbio (seta) estabelecendo conexão com o tecido do calo. (a) ápice meristemático caulinar, (c) calo, (g) gema. (A) Barra = 50 μ m. (C, D, E, F) Barra = 100 μ m.....	55

REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE *Eucalyptus camaldulensis* DEHN. A PARTIR DAS FOLHAS COTILEDONARES

RESUMO

A regeneração é uma resposta morfogênética de um explante a um estímulo que resulta na formação de uma parte aérea, radicular ou planta. Este trabalho teve como objetivo otimizar protocolos de regeneração de plantas já estabelecidos para o gênero *Eucalyptus*. Folhas cotiledonares de *E. camaldulensis* foram cultivadas em meio de Murashige e Skoog (1962) suplementado com combinações de ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP). O tratamento mais eficiente em termos de regeneração indireta de gemas foi 2,7 µM de ANA combinado com 4,44 µM de BAP, o qual foi utilizado nos experimentos posteriores. A manutenção dos explantes no escuro durante os trinta primeiros dias elevou a porcentagem de explantes com calos e reduziu a morte dos explantes, em comparação com os que permaneceram na luz. Modificações da composição mineral do meio MS foram comparadas, a redução de metade dos sais foi tão eficiente quanto o meio completo. O meio de cultura com a concentração de nitratos reduzida à metade apresentou-se adequado para o alongamento e enraizamento das brotações.

Palavras-chaves: espécies florestais, cultura *in vitro*, organogênese, biotecnologia de plantas

PLANT REGENERATION OF *Eucalyptus camaldulensis* DEHN. FROM COTYLEDONARY LEAVES EXPLANTS

ABSTRACT

Regeneration is a morphogenetic response of an explant to a stimulus that results in the formation of an aerial part, root or plant. The present work was aimed at optimizing regeneration process already established for *Eucalyptus* species. Cotyledonary leaves of *E. camaldulensis* were cultured in Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzylaminopurine (BAP). The most efficient treatment in terms of bud indirect regeneration (2,7 μ M NAA and 4,44 μ M BAP) was used for further experiments. When explants were maintained in dark during the 30 first days, the percentage of explants forming callus was raised and explant necrosis was reduced in comparison with light cultured explants. Mineral medium modifications were compared, and half-strength mineral medium resulted as efficient as full-strength media. For shoot elongation and rooting, MS medium with half-strength nitrate salts gave good results. Histological studies revealed the indirect origin of buds.

Key-words: forest species, *in vitro* culture, organogenesis, plant biotechnology

INTRODUÇÃO

Pertencente a família *Myrtaceae*, o *Eucalyptus camaldulensis* é originário da Austrália e caracteriza-se por ser uma espécie que apresenta elevado potencial adaptativo às condições tropicais brasileiras. As ótimas características físico-químicas da sua madeira permitem amplas utilizações. Embora apresente pouca aceitação para a indústria de celulose, destaca-se como boa alternativa para utilização em marcenaria, construções e para fins energéticos, como produção de lenha e carvão.

Todas as espécies do gênero *Eucalyptus* são perenes e apresentam polinização cruzada, caracterizando freqüente hibridização natural interespecífica, resultando em progênies com características muitas vezes indesejáveis. Por este motivo torna-se difícil manter as características das espécies de eucalipto por métodos de propagação sexual.

Os métodos tradicionais de melhoramento genético na área florestal, embora eficientes, são relativamente lentos, principalmente devido ao tempo necessário para se completar cada geração de cruzamentos e a obtenção de progênies com as características de interesse. A transformação genética permite a introdução de genes em um curto período de tempo e conseqüentemente representa uma excelente alternativa para acelerar o processo de obtenção de genótipos superiores.

O presente estudo disponibiliza informações sobre o processo regenerativo de plantas de *Eucalyptus camaldulensis* a partir das folhas cotiledonares. Os resultados aqui descritos caracterizam a finalização da primeira etapa de um protocolo que permitirá futuros estudos de transformação genética para a espécie.

Está caracterizado como objetivo geral desta primeira etapa, que concentrou-se em obter informações sobre a organogênese da espécie, a definição de otimizações baseadas em protocolos já estabelecidos para o gênero, com o intuito de regenerar gemas adventícias a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*. Para que o objetivo proposto apresentasse resultados significativos, tornou-se necessário a definição dos objetivos específicos propostos e relacionados a seguir:

- a) Determinar a técnica de desinfestação adequada para a germinação *in vitro* das sementes de *Eucalyptus camaldulensis*;
- b) Determinar os meios de cultura adequados para as diferentes fases da regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*;
- c) Determinar a influência das condições de luminosidade no processo de calogênese e regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*;
- c) Determinar, por meio de estudos histológicos a origem das gemas adventícias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Eucalyptus*

JOLY (1998) indica que a família *Myrtaceae* está representada por cerca de 100 gêneros com aproximadamente 3.000 espécies, sendo a maior família da ordem *Myrtales*, com dois grandes centros de dispersão, nas Américas e na Austrália, embora ocorram em todo o mundo. Segundo este mesmo autor, dentre as espécies cultivadas da família *Myrtaceae* merecem especial destaque as introduzidas da Austrália, em geral com folhas alternas e fruto seco, capsular. O gênero *Eucalyptus*, eucalipto ou “calipe”, sinonímia utilizada pelos caboclos, é representado por muitas espécies não só produtoras de madeira, mas de essências importantes, como por exemplo: as medicinais e aromáticas. Além disso, no mesmo gênero existem espécies ornamentais com flores vermelhas: *Eucalyptus callistemon* e *Eucalyptus melaleuca*, de belo efeito ornamental.

Segundo as observações de ASSIS (1996), o gênero *Eucalyptus* apresenta 600 denominações, incluindo espécies, híbridos e variedades. Ocorrem em uma gama de condições ambientais que vão desde áreas pantanosas, até muito secas, solos de alta fertilidade ou até mesmo solos arenosos muito pobres. Além disso, os eucaliptos ocupam ambientes altamente variáveis, tanto em termos de precipitação quanto de temperaturas. São originárias da Austrália, Nova Guiné e Sul das Filipinas, sendo que poucas são nativas das ilhas ao norte (Java, Filipinas, Papua, Timor). Segundo CHEN e EVANS (1990), este gênero, foi introduzido para cultivo e aclimatado em várias regiões do mundo desde o século 18. De acordo com os artigos da FAO, na década de 80 o eucalipto foi introduzido para cultivo em diversos países e regiões das Américas, Europa e Índia.

O plantio do gênero em larga escala está concentrado em poucas espécies. Em termos de incremento anual e das propriedades desejáveis da madeira, apenas doze tem sido utilizadas, com mais intensidade, para atender o setor industrial: *Eucalyptus grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. viminalis*, *E. deglupta*, *E. citriodora*, *E. exserta*, *E. paniculata* e *E. robusta*.

O eucalipto é a árvore florestal mais plantada na Austrália, Ásia e América do Sul e

em algumas regiões do sul da Europa. A produção comercial deste gênero compreende 40% das florestas plantadas em todo o mundo. As principais utilizações das plantações comerciais concentram-se na produção de polpa e papel, madeira para construções, carvão e lenha. (FAO, 2001).

Com relação à produção nacional, o eucalipto é a árvore florestal mais importante do Brasil, sendo que as plantações comerciais recobrem mais de 4 milhões de hectares, e as espécies mais utilizadas são: *Eucalyptus grandis* (55%), *Eucalyptus saligna* (17%), *Eucalyptus urophylla* (9%), *Eucalyptus viminalis* (2%), híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* (11%) e outras espécies (6%) (FAO, 2001).

FERREIRA (1979) descreve os eucaliptos como sendo as plantas de mais rápido crescimento e as árvores mais altas do mundo, sendo que algumas espécies podem atingir mais de quatro metros em apenas um ano. Existem espécies cujas árvores registram alturas superiores a 100 m. Na Austrália e ilhas vizinhas, de onde é nativo, o eucalipto forma extensas florestas de altas árvores com poderosos troncos. Os eucaliptos também são ricos em óleos voláteis amplamente utilizados na indústria farmacêutica e perfumaria, com mais de 40 diferentes tipos registrados.

Todo tipo de vegetação, incluindo os eucaliptais, desempenha importante papel na melhoria da qualidade do ar, pela absorção parcial ou total de gases poluentes (dióxido de enxofre, dióxido de nitrogênio, ozônio, entre outros), retendo partículas em sua parte aérea (MOHR, 1987 e MATHER, 1990), e pela liberação de oxigênio para a atmosfera durante o processo fotossintético (SILVA, 1994).

Os eucaliptais são grandes agentes na minimização do efeito estufa, pois apresentam-se como depósitos naturais de carbono (SILVA, 1994). A capacidade estimada de fixação de carbono, para espécies arbóreas de rápido crescimento, é da ordem de 2,7 t de carbono/ha/ano (SALATI, 1993).

Em fase adiantada de crescimento, os eucaliptais contribuem para a minimização dos efeitos erosivos, protegendo a fertilidade do solo (HUNTER JÚNIOR, 1990). A diminuição da turbidez e do assoreamento dos mananciais hídricos também destaca-se como notável função destas espécies florestais (SILVA, 1994).

Por apresentarem rápido crescimento e grande adaptabilidade, os eucaliptais merecem especial atenção quanto à função de recuperação de áreas degradadas pela ação antrópica (SIQUEIRA JÚNIOR, 1992). Os eucaliptais constituem-se em importante fonte de energéticos renováveis (lenha e carvão vegetal), contribuindo para a redução da pressão sobre as áreas de vegetação nativa (SILVA, 1994).

Econômica e cientificamente, reconhece-se que os plantios de eucaliptos

contribuíram muito para o enriquecimento da pesquisa florestal em todo o mundo, gerando conhecimentos científicos e tecnológicos e empregos diretos e indiretos ao longo do seu processo produtivo, tais como: industrialização, beneficiamento da madeira e subprodutos.

2.2 *Eucalyptus camaldulensis* DEHN.

2.2.1 Características morfológicas

Conforme descrição de RIZZINI (1971), a árvore de *Eucalyptus camaldulensis* apresenta altura compreendendo os valores entre 24 a 36 m e 90 a 210 cm de diâmetro nas localidades onde é espontânea, sendo o mais difundido dos *Eucalyptus*. O fuste é relativamente curto, mas grosso, a copa ampla. A casca na base do tronco chega a 5 cm de espessura, de cor cinzenta forte, rígida. As folhas são estreitamente lanceoladas, um tanto aromáticas quando esmagadas, as flores em umbelas, frutos pedicelados e sementes de formas variáveis.

2.2.2 Ocorrência e exigências edafoclimáticas

A espécie *Eucalyptus camaldulensis* DEHN. é representada por árvores frondosas que crescem às margens dos rios, sendo encontradas ao longo de toda a Austrália exceto na Tasmânia. As áreas principais de ocorrência estão situadas entre as latitudes de 15,5 a 38 ° S, e nas altitudes variando de 30 a 600 m. A precipitação média anual varia de 250 a 625 mm com chuvas concentradas no inverno e no verão. Nestas regiões, a temperatura média das máximas do mês mais quente situa-se entre 29 e 35 °C, enquanto que a temperatura média das mínimas do mês mais frio situa-se entre 11 e 20 °C. O período seco varia de 4 a 8 meses ou mais (FERREIRA, 1979).

2.2.3 Importância econômica e silvicultural

Na Austrália, a madeira é muito utilizada para serraria, dormentes e carvão. Considera-se o *Eucalyptus camaldulensis* uma das espécies mais adequadas para zonas críticas de reflorestamento, onde as deficiências hídricas e problemas ligados ao solo sejam fatores limitantes para outras espécies. Nos estudos efetuados no Estado de São Paulo, a

espécie demonstrou ser útil para serraria, postes, dormentes, mourões, lenha e carvão. Para celulose e papel a espécie não é muito aceita (FERREIRA, 1979). Para a produção de madeira em regiões tropicais brasileiras, *Eucalyptus camaldulensis* tem-se apresentado como excelente opção, em função de sua versatilidade, adaptabilidade, potencial de produção e características físico-mecânicas (SOUZA, 1999).

A madeira de *Eucalyptus camaldulensis* é dura, muito durável e resistente aos cupins. Extremamente empregada na Austrália para muitos fins, fornecendo os melhores dormentes; serve para todos os tipos de construções pesadas além de ser uma das melhores madeiras para marcenaria (RIZZINI, 1971). Nos países onde a espécie foi introduzida com sucesso, foram constatadas muitas vantagens do cultivo do *Eucalyptus camaldulensis*. Entre elas pode-se destacar: alta adaptação em regiões caracterizadas por solos pobres e prolongada estação seca, tolerância a inundações periódicas e moderada resistência a geadas (FERREIRA, 1979).

2.3 Regeneração *in vitro*

Em cultura de tecidos, o termo "regeneração" significa uma resposta morfogênica de um explante a um estímulo, resultando na formação de uma parte aérea, raízes, embriões ou em uma planta inteira. Neste processo, células diferenciadas sofrem desdiferenciação, assumindo características meristemáticas e, em seguida, são reprogramadas, diferenciando-se em órgãos especializados. A regeneração pode ocorrer via organogênese ou embriogênese somática (TORRES et al., 2000).

A organogênese pode ocorrer de duas formas bastante distintas: indiretamente quando a formação de gemas ou raízes passa pela fase de calogênese ou diretamente quando a neoformação ocorre a partir do próprio explante, sem a formação de calos (TORRES et al., 2000).

As células vegetais são autônomas e apresentam potencialidade para regenerar novas plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados, sendo alguns tecidos mais favoráveis para a regeneração de gemas, raízes ou embriões do que outros. Segundo KERBAUY (1993), "as diferenças celulares seriam estabelecidas e mantidas pelas influências mútuas das células e dos tecidos entre si (ambiente celular interno)".

O processo de regeneração de gemas é resultado do efeito de pelo menos três grupos de fatores inter-relacionados. Em primeiro lugar estão as potencialidades que podem ser expressas durante o desenvolvimento celular. Em segundo lugar, podemos citar as

características originadas durante a ontogênese, que inicialmente são reguladas pelos estímulos externos (luz, temperatura, composição do meio de cultura), estímulos estes que permitem que as células vegetais possam manifestar competência, isto é, tornar-se capazes de reagirem a sinais específicos e iniciarem o desenvolvimento. E, em último lugar, estão as expressões que dependem apenas do ambiente (KERBAUY, 1993)..

2.4 A cultura *in vitro* do *Eucalyptus camaldulensis*

2.4.1 Desinfestação das sementes de *Eucalyptus camaldulensis* para o cultivo *in vitro*

GEORGE (1993) enfatiza que, para o estabelecimento de cultura *in vitro* de *Eucalyptus*, a utilização de explantes provenientes de plântulas germinadas *in vitro* é a forma mais fácil de se conseguir sucesso no estabelecimento da cultura, pois explantes juvenis de árvores adultas, como por exemplo: ápices meristemáticos, caulinares e radiculares, são muito difíceis de serem descontaminados e inviabilizam o trabalho.

Sementes de *Eucalyptus camaldulensis* podem ser desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de cálcio 7% por 20 minutos e lavadas 3 vezes com água estéril (DIALLO e DUHOUX, 1984). De acordo com experimentos de OSSOR e BOXUS (1992), as sementes desta espécie podem ser desinfestadas com hipoclorito de cálcio 9% e quatro gotas de Tween[®] 20. A solução com as sementes deve ser mantida sob agitação por 20 minutos. Já para HO et al. (1998), a desinfestação pode ser realizada por imersão em etanol 70% (vol/vol) durante 1 minuto, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% com tratamento ultrasônico por 15 minutos. De acordo com trabalho de ITO et al. (1996), sementes da mesma espécie podem ser desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio com 5% de cloro ativo por um período de uma hora, etanol 70% por 2 minutos e finalmente enxágüe triplo com água estéril.

2.4.2 Meios de cultura

GRATTAPAGLIA e MACHADO (1990) ressaltam que diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no início do cultivo e enfatizam que, embora não exista uma formulação padrão, o meio MS e suas modificações e diluições têm apresentado bons resultados para diversas espécies de *Eucalyptus*.

A redução de nitrogênio na forma amoniacal no meio MS tem sido recomendada

como medida para combater a vitrificação das culturas, considerada um dos problemas na fase de multiplicação de espécies arbóreas (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977; ZIV et al., 1987). As concentrações de sacarose, ou de outra fonte de açúcar, têm também efeito sobre a multiplicação e o crescimento, as concentrações de 2 a 4% (m/vol) sendo as mais comuns.

2.4.2.1 Meios de cultura para germinação *in vitro* das sementes de *Eucalyptus camaldulensis*

A germinação em condições *in vitro* de sementes de *Eucalyptus camaldulensis* pode ser realizada utilizando o meio de cultura MS suplementado com 3% de sacarose, 100 ml de leite de coco, 200 mg de glutamina e 100 mg de caseína hidrolizada (HO et al., 1997). Para sementes da mesma espécie, a germinação pode ser realizada com sucesso utilizando o meio de cultura B5 (GAMBORG et al., 1968) suplementado com 3% de sacarose e 0,6% de ágar (ITO et al., 1996).

2.4.2.2 Meios de cultura para indução de calos e gemas em *Eucalyptus camaldulensis*

De acordo com o trabalho de HO et al. (1997), para a indução de calos e regeneração das gemas a partir de folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*, pode-se utilizar 16,2 μM de ANA e 4,44 μM de BAP.

Em outro trabalho, MULLINS et al. (1996), realizaram com sucesso a regeneração de gemas de *Eucalyptus camaldulensis* usando explantes de folhas cultivadas *in vitro*. O meio de cultura utilizado para a regeneração dos brotos foi uma adaptação do meio de cultura de MURALIDHARAN e MASCARENHAS (1987), suplementado com 1,0 g.L⁻¹ de caseína, 50 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 % de phytagar, em pH 5,9. Os reguladores de crescimento foram ANA e BAP a 16,2 μM e 0,44 μM respectivamente.

AREZKI et al. (1999) observaram a iniciação e proliferação de aglomerados meristemáticos *in vitro* em explantes de *Eucalyptus camaldulensis* utilizando o meio MAS fundamentado no meio MS adicionado de 3% de sacarose, 0,5% de ágar, 0,2% de carvão ativado e 5 μM de AIB.

DIALLO e DUHOUX (1984) obtiveram regeneração de plantas de *Eucalyptus camaldulensis* a partir das folhas cotiledonares utilizando o meio MS suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose, ANA (5,4 μM) associado a BAP (2,22 a 3,11 μM). Para o desenvolvimento e multiplicação das gemas, as concentrações favoráveis de ANA foram de 0,0054 a 0,54 μM e de BAP 0,88 a 2,22 μM e, para o alongamento das mesmas, foi adicionado 1,44 μM de

GA₃.

2.4.2.3 Meios de cultura para enraizamento dos brotos (micro-estacas) de *Eucalyptus*

De acordo com citações de TORRES et al. (1998), a rizogênese ocorre entre a primeira e terceira semana de cultivo e pode ser dividida em três fases: indução, iniciação e alongamento das raízes. Enquanto as duas primeiras fases respondem ou dependem de auxina, o crescimento das raízes é inibido pela presença deste fitorregulador. A dificuldade num sistema de micropropagação está em determinar uma condição *in vitro* na qual todas essas fases possam ocorrer normalmente e, de preferência, sem demandar manipulação adicional de uma fase para a outra. As diluições das formulações básicas dos meios de cultura têm possibilitado melhor enraizamento mesmo na presença de auxinas. Altas concentrações de sais tendem a inibir as fases do enraizamento, particularmente a de crescimento de raízes.

Na etapa do enraizamento, as modificações na composição mineral do meio de cultura são inúmeras e variam de acordo com a espécie, sendo as diluições de 1/2, 1/3 e 1/4 da concentração salina do meio MS, as mais freqüentes para esta fase. Diluições excessivas dos macronutrientes podem levar a deficiências minerais na parte aérea enraizada. A concentração de sacarose do meio de enraizamento é mantida nos mesmos níveis do meio de multiplicação, entre 2 e 3% (m/vol), a disponibilidade de fonte de energia sendo indispensável para a rizogênese. Em algumas situações, a manutenção de vitaminas e inositol nos meios de multiplicação pode proporcionar bons resultados no enraizamento. O ácido ascórbico pode ser utilizado como antioxidante para reduzir o escurecimento das raízes (TORRES et al., 1998).

Tipos e concentrações de auxina são as variáveis que, em geral, mais influenciam o enraizamento. A adição de outros fitorreguladores é desnecessária ou mesmo prejudicial. No entanto, já foram relatados casos onde a adição de citocinina ou giberelinas foi favorável para o enraizamento. Pode-se utilizar diversas auxinas isoladamente ou combinadas, em intervalos de 24 a 96 horas, para a indução de enraizamento em *Eucalyptus*. Na tentativa de otimizar um único meio para enraizamento desta espécie, obteve-se o enraizamento na presença de 0,1% de carvão e uma combinação de AIB-AIA nas concentrações de 15 e 2,3 μM respectivamente (TORRES et al., 1998). Já HO et al. (1998) utilizaram, para a indução do enraizamento, o meio MS modificado, com alta concentração de micronutrientes e concentração intermediária de macronutrientes, adicionado de 5 μM de AIB. DIALLO e DUHOUX (1984) utilizaram, para o enraizamento de brotos de *Eucalyptus camaldulensis*, o

ANA nas concentrações de 0,54 a 5,4 μM .

GEORGE (1993) também recomenda baixas concentrações de macronutrientes (1/4 ou 1/2) do meio MS para a etapa de enraizamento do eucalipto. Segundo este autor, igualmente podem ser utilizados os meios de cultura WPM (LLOYD e McCOWN, 1981) ou WHITE (1943). Para otimizar a formação de raízes, as gemas devem ser pré-incubadas no escuro por um período que pode variar de 3 a 10 dias antes de serem colocadas em contato com a luz. Após o período de indução, as plântulas podem ser repicadas em meio semi-sólido sem suplementação de auxinas, acrescido de 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. Os brotos que obtiverem bom desenvolvimento de raízes podem finalmente ser transferidos para meio de cultura líquido suplementado com carvão ativado durante 2 ou 3 semanas antes da aclimação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos de cultura de tecidos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

3.2 Condições de cultura *in vitro*

Todas as culturas *in vitro* foram desenvolvidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo fotossintético de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. As lâmpadas utilizadas foram da marca OSRAM L de 110W, modelo F96T12/D/HO produzidas nos EUA.

3.3 Obtenção de plantas de *Eucalyptus camaldulensis* para utilização nos ensaios *in vitro*

As sementes de *Eucalyptus camaldulensis* utilizadas nesta pesquisa foram obtidas do Instituto de Pesquisas Florestais (IPEF), procedentes de Itabé - SP, talhão: T119, lote iBO4.

As sementes possuem formas irregulares e diferentes tamanhos (Figura 1 A-B). Por este motivo, elas necessitaram ser peneiradas para selecionar as maiores a serem utilizadas no experimento de desinfestação.

3.3.1 Experimento de desinfestação das sementes

Com o objetivo de assegurar a desinfestação das sementes de *Eucalyptus camaldulensis* para germinação *in vitro*, tratamentos com concentrações de hipoclorito de sódio variando de 1% a 9 % durante 20 minutos combinados com um pré-tratamento com e sem etanol 70% durante dois minutos foram comparados. Os tratamentos são

representados a seguir:

Tratamento 1: Controle;

Tratamento 2: Pré-tratamento com etanol 70% durante 2 minutos;

Tratamento 3: Tratamento com hipoclorito de sódio 3% durante 20 minutos;

Tratamento 4: Pré-tratamento com etanol 70% durante 2 minutos seguido de tratamento com hipoclorito de sódio 3% durante 20 minutos;

Tratamento 5: Tratamento com hipoclorito de sódio 6% durante 20 minutos;

Tratamento 6: Pré-tratamento com etanol 70% durante 2 minutos seguido de tratamento com hipoclorito de sódio 6% durante 20 minutos;

Tratamento 7: Tratamento com hipoclorito de sódio 9% durante 20 minutos;

Tratamento 8: Pré-tratamento com etanol 70% durante 2 minutos seguido de tratamento com hipoclorito de sódio 9% durante 20 minutos

Após cada tratamento, as sementes receberam enxágüe triplo com água deionizada autoclavada. Em seguida as sementes foram semeadas em placas de petri contendo o meio de cultura sólido com a concentração de sais reduzida à metade, vitaminas e compostos orgânicos do meio MS, 20 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar (Vetec®).

As placas de petri foram lacradas com filme plástico e levadas para a câmara de crescimento. Após 20 dias da data da semeadura procedeu-se as avaliações pela porcentagem de sementes germinadas e porcentagem de contaminações.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento, 100 sementes por repetição em esquema fatorial (4x2), utilizando 2 placas com 50 sementes em cada repetição.

3.4 Testes de indução de calos e gemas a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*

3.4.1 Meio de cultura de base

O meio de cultura de base foi o MS com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar (Vetec®), pH ajustado a 5,8 e autoclavado por 20 min. a 120 °C. Cada placa de petri recebeu 40 ml de meio.

3.4.2 Material vegetal

Em todos os experimentos de regeneração descritos nesta pesquisa, foram utilizados explantes de folhas cotiledonares de 15 dias de idade (Figura 1C). As folhas cotiledonares foram cortadas na base do pecíolo e colocadas com a face adaxial em contato com o meio de cultura (Figura 1D).

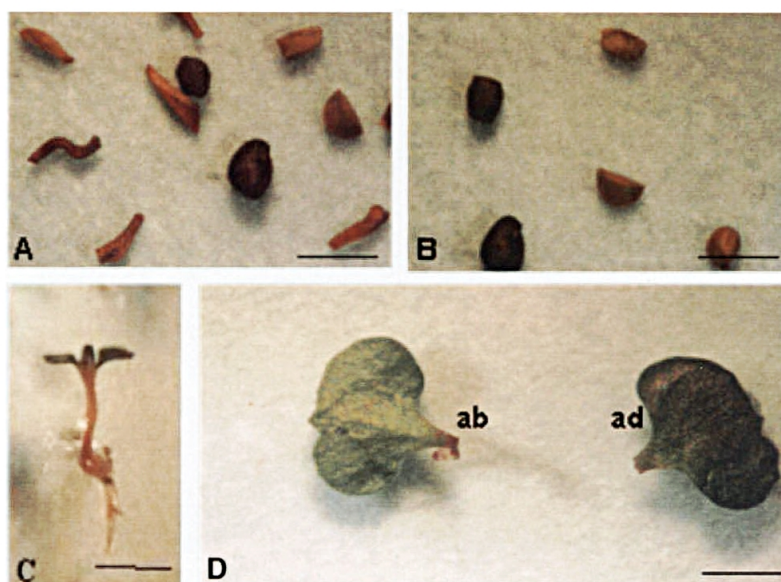


Figura 1 - Obtenção das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*. (A) Sementes de diferentes cores e tamanhos. Barra = 2 mm. (B) Sementes selecionadas mediante utilização de peneira. Barra = 2 mm. (C) Plântula germinada *in vitro* com 15 dias de idade. Barra = 7 mm. (D) Folhas cotiledonares cortadas na base do pecíolo, (ab) abaxial e (ad) adaxial. Barra = 2 mm.

3.4.3 Efeito da combinação de ANA e BAP na calogênese e regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*

Foram comparados 9 tratamentos resultantes da combinação entre as concentrações de 0, 2,7 e 5,4 μM de ANA e 0, 4,44 e 13,32 μM de BAP representados a seguir:

Tratamento 1: Controle sem fitorreguladores.

Tratamento 2: 4,44 μM de BAP

Tratamento 3: 13,32 μM de BAP

Tratamento 4: 2,7 μM de ANA

Tratamento 5: 2,7 μM de ANA + 4,44 μM de BAP

Tratamento 6: 2,7 μM de ANA + 13,32 μM de BAP

Tratamento 7: 5,4 μM de ANA

Tratamento 8: 5,4 μM de ANA + 4,44 μM de BAP

Tratamento 9: 5,4 μM de ANA + 13,32 μM de BAP

Aos trinta dias após o início da cultura, os explantes foram transferidos para os mesmos meios.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 5 repetições (placas de petri) por tratamento, em esquema fatorial (3x3), cada unidade experimental contendo 4 explantes.

3.4.4 Efeito da ausência de luz na indução de calos e gemas a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*

Foram testadas as duas combinações de reguladores de crescimento que resultaram nas maiores porcentagens de explantes regenerando gemas no experimento anterior, acrescidos de controle. Os tratamentos são representados a seguir:

Tratamento 1: Controle sem fitorreguladores (luz)

Tratamento 2: Controle sem fitorreguladores (escuro)

Tratamento 3: 2,7 μM de ANA + 4,44 μM de BAP (luz)

Tratamento 4: 2,7 μM de ANA + 4,44 μM de BAP (escuro)

Tratamento 5: 5,4 μM de ANA + 4,44 μM de BAP (luz)

Tratamento 6: 5,4 μM de ANA + 4,44 μM de BAP (escuro)

As placas foram incubadas em câmara de crescimento, e as unidades experimentais referentes aos tratamentos no escuro tiveram suas placas envoltas com papel alumínio durante 30 dias. Aos trinta dias após o início da cultura, os explantes foram transferidos para os meios correspondentes a cada tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento em esquema fatorial (3x2), utilizando 5 placas com 8 explantes em cada.

3.4.5 Efeito das modificações do meio de cultura MS na regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*.

Os tratamentos comparados foram os seguintes:

Tratamento 1: MS completo (controle)

Tratamento 2: MS ½ da concentração de sais minerais (macro e micronutrientes)

Tratamento 3: MS ½ da concentração de macronutrientes

Tratamento 4: MS ½ da concentração de nitratos de potássio e amônio (KNO₃ e NH₄NO₃)

Em todos os tratamentos, as concentrações de vitaminas, compostos orgânicos, sacarose e ágar (Vetec®) do meio de base permaneceram inalteradas. A suplementação com fitorreguladores utilizada foi 2,7 µM de ANA e 4,44 µM de BAP. Aos trinta dias após o início da cultura, os explantes foram transferidos para os meios correspondentes a cada tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos, 5 repetições por tratamento, utilizando 5 placas com 8 explantes em cada.

3.4.6 Efeito do tempo de permanência dos explantes em meio de cultura MS na regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*.

Em todos os tratamentos, as concentrações de vitaminas, compostos orgânicos, sacarose e ágar (Vetec®) do meio de base permaneceram inalteradas. A suplementação com fitorreguladores utilizada foi 2,7 µM de ANA e 4,44 µM de BAP.

Os tratamentos comparados foram os seguintes:

Tratamento 1: Transferência dos explantes aos 30 dias para meio MS com fitorreguladores

Tratamento 2: Permanência dos explantes durante 60 dias no mesmo meio contendo fitorreguladores

Tratamento 3: Transferência dos explantes aos 30 dias para meio sem fitorreguladores

Os explantes permaneceram no escuro durante os trinta primeiros dias e após este período foram realizadas as transferências para os meios correspondentes a cada tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 3 tratamentos, 5 repetições por tratamento, utilizando 5 placas com 8 explantes em cada.

3.5 Avaliação dos experimentos

As placas foram incubadas em câmara de crescimento e aos 30 dias, com auxílio de um microscópio estereoscópico, foram avaliadas as porcentagens de explantes formando calos e o local de origem dos mesmos. Em seguida, os explantes foram transferidos para os meios de culturas correspondentes a cada tratamento e mantidos na luz. Aos 60 dias após a inoculação, foram avaliados a porcentagem de explantes que regeneraram gemas, o número de gemas, o local de origem das gemas e a porcentagem de explantes mortos.

3.5 Análise estatística

Os experimentos foram repetidos três vezes e os valores utilizados para a análise foram as médias dos valores obtidos nos três experimentos. Após a confirmação da homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett, realizou-se a análise de variância para detectar se haviam diferenças significativas entre as médias dos tratamentos aos níveis de 1% e 5% de probabilidade. O teste de Tukey ao nível de 5% de significância foi utilizado para a comparação das médias dos tratamentos.

Para os resultados referentes aos experimentos de desinfestação e germinação das sementes, efeito das combinações de ANA e BAP na calogênese e regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares e efeito da ausência de luminosidade na indução de calos e gemas em folhas cotiledonares, foram ajustadas equações de regressão entre cada variável estudada em função dos tratamentos comparados. O modelo de equação ajustado foi de uma parábola :

$$y = b_0 + b_1 X + b_2 X^2$$

onde y = variável considerada

X = tratamento aplicado

b_0, b_1, b_2 = coeficientes do modelo

3.7 Testes de alongamento e enraizamento das gemas

Explantes com gemas regeneradas nos meios de cultura contendo 2,7 μM de ANA + 4,44 μM de BAP e 5,4 μM de ANA + 4,44 μM de BAP, foram submetidos aos experimentos de alongamento e enraizamento aplicados em duas épocas distintas. Os tratamentos

comparados foram os seguintes:

Teste 1: MS completo sem adição de carvão ativado

Teste 2: MS com a concentração de nitratos de amônio e potássio reduzida à metade + 0,2% de carvão ativado.

Nos 2 casos, as concentrações de vitaminas, compostos orgânicos, sacarose e ágar (Vetec®) do meio de base permaneceram inalteradas. Cada tratamento foi composto por 12 frascos com 2 explantes. Cada explante apresentava um número variado de brotos com aproximadamente 0,5 cm de altura. Após trinta e sessenta dias foi observado o desenvolvimento das brotações, o número e comprimento das raízes e a presença de calos nas folhas.

3.8 Estudo histológico dos explantes em fase regenerativa

O estudo histológico dos explantes em fase regenerativa foi conduzido no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Para a análise anatômica as amostras foram processadas segundo as técnicas de FEDER E O'BRIEN (1968) para inclusão em glicol metacrilato (GMA) seguido das recomendações do fabricante (JB4 - Poliscience®).

Foram retiradas amostras de folhas cotiledonares cultivadas em meio de cultura sem fitorreguladores (controle) e amostras de folhas cotiledonares cultivadas em meio de cultura com 2,7 µM de ANA + 4,44 µM de BAP após 60 dias de cultivo em diferentes estágios de diferenciação celular.

As amostras foram fixadas em solução F.A.A. (90 ml de etanol P.A. 50% + 5ml de ácido acético + 5 ml de formaldeído), (JOHANSEN, 1940) durante quarenta e oito horas. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em etanol 70%, 90% e 100% por no mínimo duas horas em cada solução. Em seguida procedeu-se a parainfiltração em solução de etanol 100% + resina líquida na proporção de 1:1 por um período de quatro horas sob vácuo. Após a parainfiltração, as amostras foram transferidas para a solução de infiltração denominada de MEIO A que consiste na mistura proporcional de 100 mL de resina líquida acrescida de 0,9 g de ativador. O MEIO A foi preparado de acordo com as indicações do fabricante misturando-se as duas substâncias com o auxílio de um agitador magnético. As amostras permaneceram imersas nesta solução sob vácuo e temperatura ambiente por 24

horas.

A solução de polimerização denominada de MEIO B (25 ml de MEIO A + 1ml de endurecedor Handner®) foi vertida em moldes de polietileno onde as amostras foram dispostas de acordo com a orientação desejada. As placas de moldes foram levadas em estufa a 40°C até a polimerização da resina.

Os blocos contendo as amostras foram colados em tacos de madeira com Superbonder® e mantidos em estufa a 40°C por aproximadamente três dias.

Para o seccionamento do material vegetal foi utilizado um micrótomo rotativo com navalha de aço do tipo C. A espessura de corte utilizada foi de 7µm. As secções foram distendidas em água e aderidas às lâminas histológicas.

Após este procedimento as lâminas foram secadas em placa aquecedora com temperatura ajustada a 40°C por aproximadamente 20 minutos.

As lâminas histológicas foram coradas com Azul de Toluidina a 0,05% por 10 minutos (O'BRIEN et al., 1965) e lavadas em água corrente por aproximadamente 5 minutos. Novamente as lâminas foram colocadas para secar em placa aquecedora com temperatura ajustada a 40°C por aproximadamente 20 minutos e montadas em resina sintética (Entelan®).

As ilustrações foram feitas em microscópio Olympus® com câmera digital acoplada da mesma marca. As escalas foram projetadas nas mesmas condições ópticas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento de desinfestação das sementes de *Eucalyptus camaldulensis*

Os resultados da análise de variância para a porcentagem de sementes germinadas e porcentagem de contaminações são apresentados na Tabela 1.

A análise de variância (Tabela 1) revelou que a interação entre os pré-tratamentos com e sem a utilização de etanol 70% durante 2 minutos e os tratamentos com hipoclorito de sódio durante 20 minutos foi estatisticamente significativa para as variáveis porcentagem de sementes germinadas e porcentagem de contaminações, indicando que não são independentes.

TABELA 1 - Resultados da análise de variância para a porcentagem de germinação e de contaminação de sementes de *Eucalyptus camaldulensis* em função das concentrações de hipoclorito de sódio e do pré-tratamento com etanol 70%.

FATOR DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	
		% Germinações	% Contaminações
Tratamentos	3	4780,21 **	418,78 **
Condição	1	1,12 ^{ns}	282,03 **
Tratamentos x Condição	3	1620,04 **	55,61**
Erro Experimental	24	171,12	8,03
Coeficiente de variação (%)		46,23	54,76
Teste de Bartlett (X^2)		1,37 ^{ns}	1,43 ^{ns}

^{ns} F não significativo

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade

Com relação à variável porcentagem de sementes germinadas, o teste de comparação de médias (Tabela 2) comprovou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os pré-tratamentos e os tratamentos com hipoclorito de sódio estudados. Para o controle e o pré-tratamento com etanol 70% durante 2 minutos, as médias não diferiram estatisticamente entre si embora a maior porcentagem de sementes germinadas (43%) foi observada utilizando-se o pré-tratamento com etanol 70% durante 2 minutos. Para a concentração de 3% de hipoclorito de sódio não houve diferenças estatisticamente significativas entre as condições comparadas. Para a concentração 6% de hipoclorito de sódio, apesar do teste de comparação de médias não ter demonstrado diferenças

estatisticamente significativas, as sementes que não receberam pré-tratamento com etanol 70% apresentaram uma maior porcentagem de sementes germinadas (82,5%). Para a concentração de 9% de hipoclorito de sódio, o teste de comparação de médias revelou diferenças estatisticamente significativas para a porcentagem de sementes germinadas, comprovando que as sementes que não receberam pré-tratamento apresentaram 74,75% de germinação enquanto que as sementes que receberam pré-tratamento apresentaram uma porcentagem de germinação de 49,50%.

TABELA 2 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias de germinação de sementes de *Eucalyptus camaldulensis* em função das concentrações de hipoclorito de sódio e o pré-tratamento com etanol 70%.

Condição	Concentrações de hipoclorito de sódio			
	0	3	6	9
Sem pré-tratamento	5,0 b	75,50 a	82,50 a	74,75 a
Com pré-tratamento	43,0 b	79,75 a	64,25 ab	49,50 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Para a variável porcentagem de sementes contaminadas, o teste de comparação de médias comprovou (Tabela 3) a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os pré-tratamentos e os tratamentos com hipoclorito de sódio estudados. Para o controle não pré-tratado com etanol 70% durante 2 minutos, as médias não diferiram estatisticamente entre si embora a menor porcentagem de sementes contaminadas (11,50%) foi observada utilizando-se o pré-tratamento com etanol 70% durante 2 minutos. Para a concentração de 3% de hipoclorito de sódio não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as condições comparadas, embora tenha ocorrido uma menor porcentagem de contaminações nas sementes que receberam o pré-tratamento. Para a concentração de 6% de hipoclorito de sódio, apesar do teste de comparação de médias não ter revelado diferenças estatisticamente significativas, as sementes que receberam pré-tratamento com etanol 70% apresentaram uma menor porcentagem de contaminações (3,75%). Para a concentração de 9% de hipoclorito de sódio, o teste de comparação de médias revelou diferenças estatisticamente significativas, comprovando que as sementes que receberam pré-tratamento apresentaram a menor porcentagem de contaminações (1,25).

TABELA 3 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias de sementes de *Eucalyptus camaldulensis* contaminadas em função das concentrações de hipoclorito de sódio e do pré-tratamento com etanol 70%

Condição	Concentrações de hipoclorito de sódio			
	0	3	6	9
Sem pré-tratamento	24,75 a	7,75 b	6,50 bc	2,75 c
Com pré-tratamento	11,50 a	1,50 b	3,75 b	1,25 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Foram ajustadas equações de regressão lineares para representar a relação entre as concentrações testadas e a porcentagem de sementes germinadas e contaminadas para as duas condições de cultivo (Figuras 2, 3, 4 e 5).

Para as sementes que não receberam o pré-tratamento com etanol 70% durante dois minutos (Figura 2), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 7,45 + 26,825 X - 2,18056 X^2 (R^2 = 87,08\%)$$

onde: Y = porcentagem de sementes germinadas

X = concentração de hipoclorito de sódio

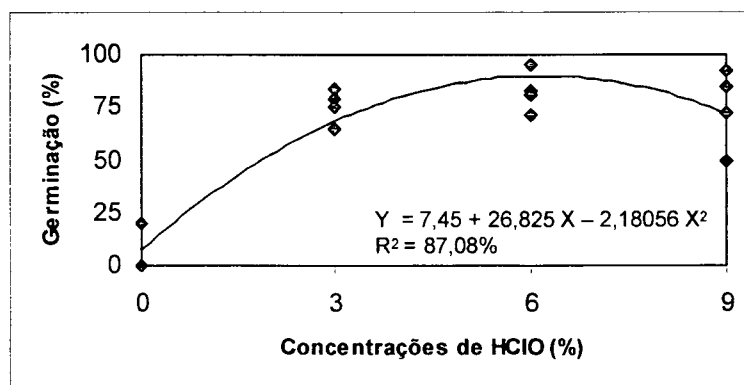


Figura 2 – Equação de regressão ajustada para o efeito das concentrações de hipoclorito de sódio (HClO) sem o pré-tratamento com etanol 70% na germinação das sementes de *Eucalyptus camaldulensis*

Para a variável porcentagem de contaminações (Figura 3) a equação ajustada foi:

$$Y = 23,8375 - 5,55417 X + 0,368056 X^2 (R^2 = 85,18\%)$$

Onde: Y = porcentagem de sementes contaminadas

X = concentração de hipoclorito de sódio

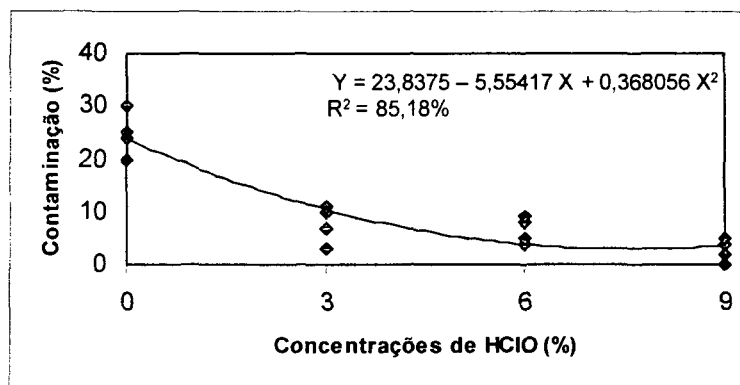


Figura 3 – Equação de regressão ajustada para o efeito das concentrações de hipoclorito de sódio (HClO) sem o pré-tratamento com etanol 70% na contaminação das sementes de *Eucalyptus camaldulensis*

Para as sementes que receberam o pré-tratamento com etanol 70% durante dois minutos (Figura 4), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 45,65 + 13,0083 X - 1,43056 X^2 \quad (R^2 = 40,14\%)$$

onde: Y = porcentagem de sementes germinadas

X = concentração de hipoclorito de sódio

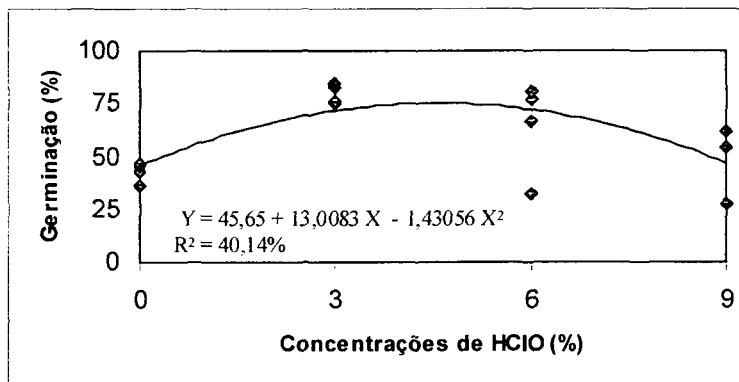


Figura 4 – Equação de regressão ajustada para o efeito das concentrações de hipoclorito de sódio (HClO) com o pré-tratamento com etanol 70% na germinação das sementes de *Eucalyptus camaldulensis*

Para a variável porcentagem de contaminações (Figura 5) a equação ajustada foi:

$$Y = 10,65 - 2,825 X + 0,2083 X^2 \quad (R^2 = 62,84\%)$$

onde: Y = porcentagem de sementes contaminadas

X = concentração de hipoclorito de sódio

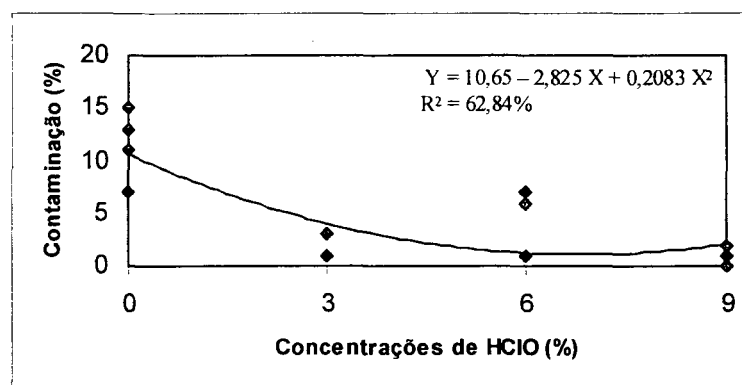


Figura 5 – Equação de regressão ajustada para o efeito das concentrações de hipoclorito de sódio (HClO) com o pré-tratamento com etanol 70% na contaminação das sementes de *Eucalyptus camaldulensis*

Como resultado deste experimento, ficou comprovada estatisticamente a eficiência do pré-tratamento com etanol 70% durante dois minutos e do tratamento com hipoclorito de sódio 6%. Com base na observação dos resultados obtidos, a técnica mais adequada para a desinfestação de sementes de *Eucalyptus camaldulensis* para germinação *in vitro* deve respeitar as seguintes etapas:

- Seleção das sementes mediante a utilização de peneira com malha capaz de reter somente as sementes maiores. Após a seleção das sementes, todas as etapas seguintes devem ser realizadas em ambiente estéril (capela de fluxo laminar);
- Pré-tratamento com etanol 70% durante 2 minutos;
- Tratamento com hipoclorito de sódio 6% + 5 gotas de TWEEN® 20 por 100mL, agitando a solução contendo as sementes durante 20 minutos;
- Enxágüe triplo com água deionizada autoclavada.

4.2 Experimentos de indução de calos e gemas a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*

4.2.1 Efeito de combinações de ANA e BAP na calogênese e regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*

Os resultados da análise de variância para a porcentagem de explantes com calos, porcentagem de explantes regenerando gemas, número de gemas por explante e porcentagem de explantes mortos são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 - Resultados da análise de variância para a porcentagem de explantes formando calos, porcentagem de explantes regenerando gemas, número de gemas por explante e porcentagem de explantes mortos em *Eucalyptus camaldulensis*

FATOR DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO			
		Explantes com calos (%)	Explantes com gemas (%)	Gemas por explante (Nº)	Explantes mortos (%)
ANA	2	5354,47 **	466,20 **	54,86 ^{ns}	414,69 ^{ns}
BAP	2	3037,07 **	4061,06 **	392,03 **	1170,69 **
ANA X BAP	4	3253,03 **	99,06 ^{ns}	13,23 ^{ns}	1351,42 **
ERRO	36	172,77	50,722	19,58	206,00
COEF. DE VARIAÇÃO (%)		18,44	42,14	96,30	48,14
TESTE DE BARTLETT		1,52 ^{ns}	1,25 ^{ns}	1,60 ^{ns}	1,16 ^{ns}

^{ns} não significativo

** significativo Ao nível de 1% de probabilidade

A análise de variância revelou que a interação entre as concentrações de ANA e BAP foi estatisticamente significativa para a variável porcentagem de explantes com calos, indicando que os fatores não são independentes (Tabela 4). O teste de comparação de médias (Tabela 5) revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de ANA e BAP estudadas. Quando o ANA não foi adicionado aos meios, a concentração de 4,44 μM de BAP foi responsável pela maior média de explantes com calos (73,60%) e foi estatisticamente igual àquela obtida com a concentração de 13,32 μM de BAP (Tabela 5). Para a concentração 2,7 μM de ANA, a concentração de 13,32 μM foi responsável pela formação de calos em 90% dos explantes embora não diferindo estatisticamente das demais concentrações de BAP estudadas (Tabela 5). Para a concentração de 5,4 μM de ANA, a concentração de 4,44 μM de BAP foi responsável pela formação de calos em 90% dos explantes e diferiu estatisticamente da concentração de 13,32 μM (Tabela 5).

TABELA 5 - Resultados do teste de Tukey para comparação das médias das porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* com calos em função das concentrações de ANA e BAP comparadas

BAP(μM)	ANA (μM)		
	0,00	2,7	5,4
0,00	0,00 b	78,20 a	76,60 ab
4,44	73,60 a	74,80 a	90,00 a
13,32	63,40 a	90,00 a	58,20 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

As cores dos calos formados nos tratamentos estudados foram bastante variadas. Esta observação pode ser explicada se considerarmos o fato de que nas folhas de eucaliptos existem uma grande quantidade de compostos fenólicos e pigmentos

denominados de antocianinas. A biossíntese destas substâncias sendo induzida pela luz, e a sacarose do meio de cultura, provavelmente são responsáveis pela gama de colorações manifestadas durante o processo de calogênese. O local predominante de origem dos mesmos foi a base do pecíolo. Segundo RAVEN et al. (2001), o movimento das auxinas é polar, ou unidirecional, sempre na direção da base ("basípeto") em caules e folhas. Esta informação explica exatamente o resultado encontrado para a calogênese observada neste estudo. O local de excisão das folhas cotiledonares foi a base do pecíolo, ou seja a região proximal da folha. A tendência da polaridade é direcionar os reguladores de crescimento e carboidratos para esta região, e provavelmente devido a este fato, ocorreu uma maior quantidade de calos na base do pecíolo da folha cotiledonar. No caso do tratamento 6 (2,7 µM de ANA + 13,32 µM de BAP), a calogênese teve início 15 dias após a inoculação e os explantes apresentavam predominância de coloração marrom brilhante (Figura 12A). Aos 30 dias podia-se observar o desenvolvimento e formação de novos calos. Aos 45 dias, observou-se a formação de calos avermelhados, marrom claro, brancos e verdes (Figura 12B). Aos 60 dias, os explantes que apresentavam calos vermelhos e verdes regeneraram gemas no pecíolo (Figura 12C) e alguns explantes que apresentavam a coloração marrom escuro adquiriram coloração branca com aspecto friável.

No caso do tratamento 8 (5,4 µM de ANA + 4,44 µM de BAP), a calogênese também teve início 15 dias após a inoculação; a maioria dos explantes apresentou calos brilhantes, com coloração marrom clara e escura. Em alguns explantes, calos verdes e brancos recobriam o pecíolo e parte do limbo. Aos 30 dias, os explantes que inicialmente apresentavam calos de coloração verde adquiriram coloração avermelhada. Aos 45 dias de cultivo foi observada a regeneração de gemas em alguns explantes que apresentavam calos vermelhos e marrom claro. Aos 60 dias, devido ao efeito da concentração elevada de ANA, foi observada calogênese nas folhas das gemas regeneradas.

Foram ajustadas equações de regressão lineares para representar a porcentagem de explantes com calos em função das concentrações de ANA e BAP comparadas. Os gráficos que representam esta variável são apresentados nas figuras 6, 7 e 8.

Para as três concentrações de BAP quando o ANA não foi adicionado (Figura 6) a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = - 5,684 E -14 + 22,485 X - 1,330 X^2 (R^2 = 84,40\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes formando calos

X = concentração de BAP (µM)

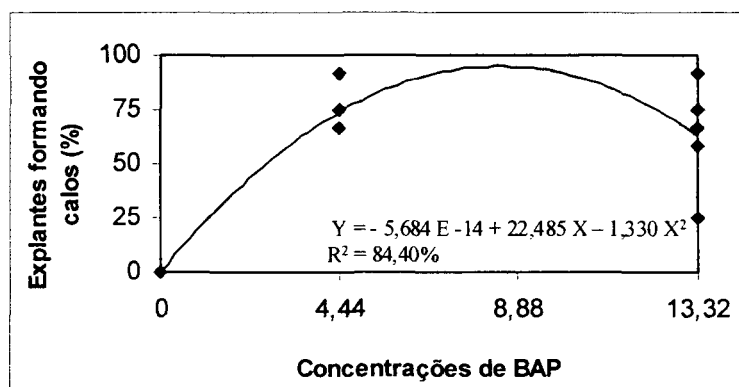


Figura 6 - Equação de regressão ajustada para porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* com calos em função das três concentrações de BAP quando o ANA não foi adicionado

Já para as três concentrações de BAP quando 2,7 μM de ANA foi adicionado aos meios de cultura (Figura 7), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 78,20 - 1,591 X + 0,186 X^2 \quad (R^2 = 29,79\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes formando calos

X = concentração de BAP (μM)

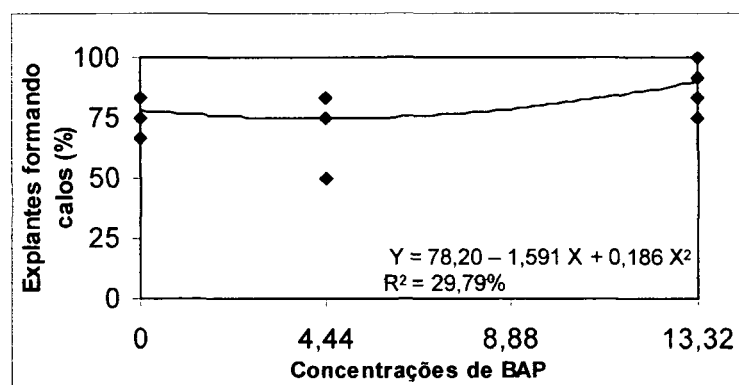


Figura 7 – Equação de regressão ajustada para porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* com calos em função das três concentrações de BAP quando 2,7 μM de ANA foi adicionado aos meios de cultura

Para as três concentrações de BAP quando 5,4 μM de ANA foi adicionado aos meios de cultura (Figura 8), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 76,60 + 5,217 X - 0,495 X^2 \quad (R^2 = 58,88\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes formando calos

X = concentração de BAP (μM)

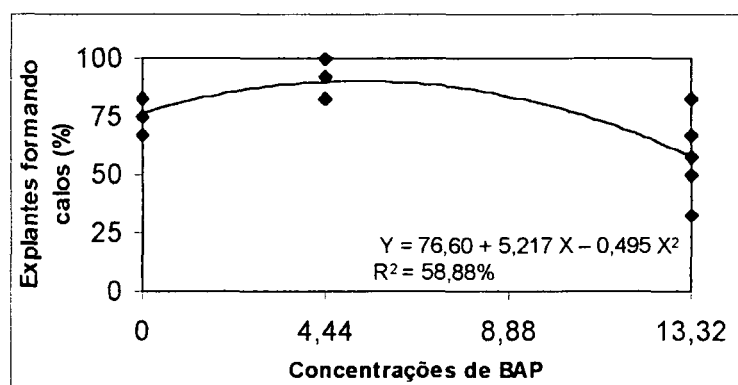


Figura 8 – Equação de regressão ajustada para porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* com calos em função das três concentrações de BAP quando 5,4 μM de ANA foi adicionado aos meios de cultura

Para a variável porcentagem de explantes regenerando gemas, a análise de variância revelou que a interação entre as concentrações de ANA e BAP não foi significativa indicando que os fatores são independentes (Tabela 4), existindo porém diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos nas diferentes concentrações de ANA e BAP estudadas (Tabelas 4 e 6). Os resultados dos testes de comparação de médias mostram que as concentrações de 2,7 μM de ANA e 4,44 μM de BAP foram responsáveis pela maior porcentagem de explantes com gemas, 22,33% e 33,93% respectivamente (Figura 13 A-C), diferindo estatisticamente entre si (Tabelas 6 e 7). O local predominante da formação das gemas foi a base do pecíolo, sendo que este resultado apresenta similaridades com os resultados encontrados por WELANDER et al. 1989. Estes autores comprovaram que a regeneração de gemas em fragmentos foliares de *Malus* ocorreu com maior frequência na região proximal dos fragmentos foliares devido ao fenômeno da polaridade ou seja, ocorreu um direcionamento das reservas de nutrientes e fitorreguladores contidas no limbo foliar para o local de excisão. Aliando esta informação aos resultados observados em nosso trabalho, podemos concluir que a intensa calogênese observada na base do pecíolo e o grau de diferenciação destes calos apresentam relação direta com a regeneração das gemas adventícias, pois a base do pecíolo foi a região predominante de formação dos calos e consequentemente a regeneração de gemas adventícias ocorreu devido à possível diferenciação das células dos calos em tecidos meristemáticos, conforme ficará comprovado no estudo anatômico dos explantes em fase regenerativa realizado nesta pesquisa.

TABELA 6 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias das porcentagens de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* regenerando gemas em função das concentrações de ANA

Concentrações de ANA (μM)	Explantes com gemas (%)
0,0	12,13 b
2,7	22,33 a
5,4	13,33 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 7 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias das porcentagens de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* regenerando gemas em função das concentrações de BAP

Concentrações de BAP (μM)	Explantes com gemas (%)
0,00	1,667 b
4,44	33,93 a
13,32	12,20 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Foram ajustadas equações de regressão lineares para representar a porcentagem de explantes regenerando gemas em função das concentrações de ANA e BAP comparadas. Os gráficos que representam esta variável são apresentados nas figuras 9, 10 e 11.

Para as três concentrações de BAP e quando o ANA não foi adicionado (Figura 9), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = -7,105 E^{-15} + 9,219 X - 0,646 X^2 \quad (R^2 = 85,75\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes regenerando gemas

X = concentração de BAP (μM)

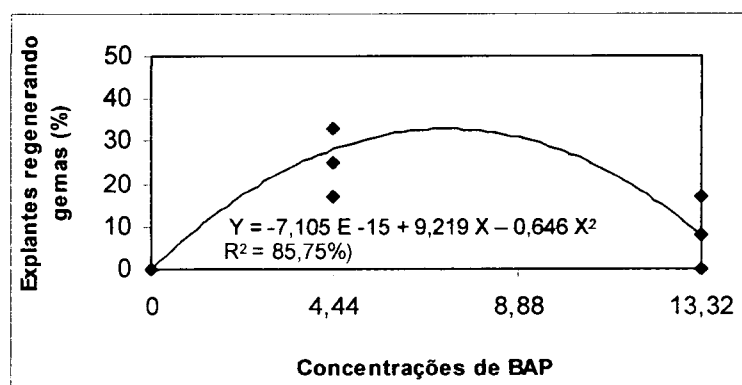


Figura 9 – Equação de regressão ajustada para porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* regenerando gemas em função das três concentrações de BAP na ausência de ANA

Já para as três concentrações de BAP e 2,7 μM de ANA (Figura 10), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 5,0 + 10,660 X - 0,646 X^2 \quad (R^2 = 74,51\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes regenerando gemas

X = concentração de BAP (μM)

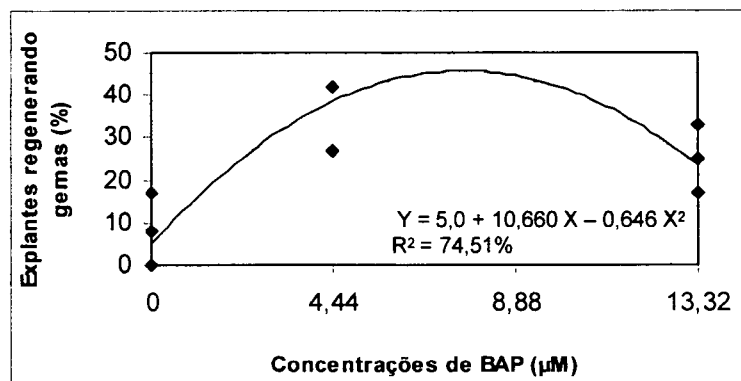


Figura 10 – Equação de regressão ajustada para porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* regenerando gemas em função das três concentrações de BAP e 2,7 μM de ANA.

Para as três concentrações de BAP e 5,4 μM de ANA (Figura 11), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = -1,421 \text{ E } -14 + 11,636 X - 0,845 X^2 \quad (R^2 = 88,27\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes regenerando gemas

X = concentração de BAP (μM)

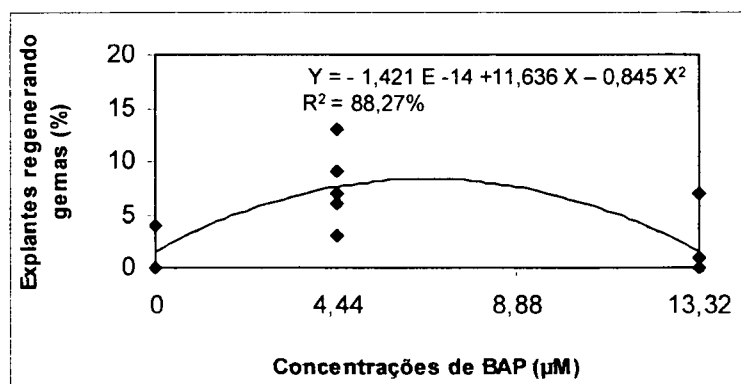


Figura 11 - Equação de regressão ajustada para porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* regenerando gemas em função das três concentrações de BAP e 5,4 μM de ANA

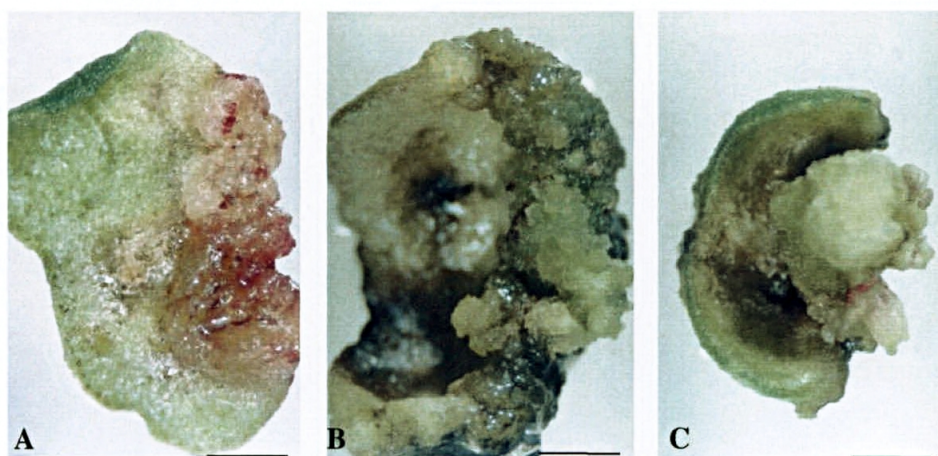


Figura 12 - Efeito de combinações de ANA e BAP sobre a calogênese. (A) Folha cotiledonar iniciando calogênese 15 dias após a inoculação em meio de cultura MS contendo $2,7 \mu\text{M}$ de ANA + $13,32 \mu\text{M}$ de BAP (tratamento 6). Barra = 1,25 mm (B) Calos verdes recobrindo o explante 30 dias após inoculação em meio de cultura MS contendo $5,4 \mu\text{M}$ de ANA + $4,44 \mu\text{M}$ de BAP (tratamento 8). Barra = 2,0 mm (C) Calos verdes formados na base do pecíolo 30 dias após a inoculação em meio MS contendo $2,7 \mu\text{M}$ de ANA + $13,32 \mu\text{M}$ de BAP (tratamento 6). Barra = 1,70 mm.

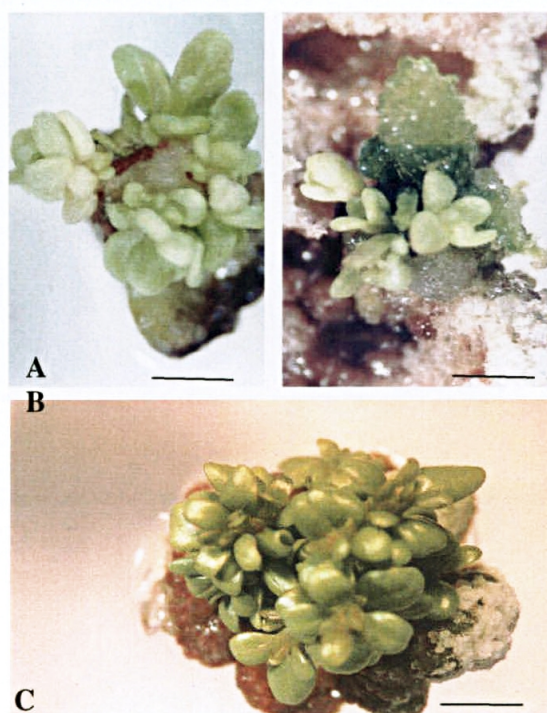


Figura 13 - Efeito de combinações de ANA e BAP na regeneração de gemas em folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*. (A) Explante regenerando gemas 30 dias após a inoculação em meio de cultura MS contendo $2,7 \mu\text{M}$ de ANA (tratamento 2). Barra = 2,3 mm. (B) Base do pecíolo iniciando regeneração de gemas 15 dias pós a inoculação em meio MS contendo $5,4 \mu\text{M}$ de ANA + $4,44 \mu\text{M}$ de BAP (tratamento 8). Barra = 1,25mm. (C) Tufo de gemas recobrindo o explante 60 dias após a inoculação em meio MS contendo $2,7 \mu\text{M}$ de ANA + $4,44 \mu\text{M}$ de BAP (tratamento 5). Barra = 2,2 mm.

Para a variável número de gemas por explante, a análise de variância revelou que a interação entre os níveis de ANA e BAP não foi significativa, indicando que os fatores são independentes (Tabela 4). Para os níveis de ANA, o teste de comparação de médias (Tabela 8) revelou que não existem diferenças estatísticas entre as concentrações estudadas sendo que a concentração de 2,7 µM de ANA foi responsável pelo maior número de gemas por explante (6,53). Para as concentrações de BAP estudadas, o teste de comparação de médias (Tabela 9) revelou que a concentração 4,44 µM foi responsável pelo maior número de explantes com gemas (10).

TABELA 8 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias dos números de gemas por explante de *Eucalyptus camaldulensis*, em função das concentrações de ANA

Concentrações de ANA (µM)	Gemas por explante (Nº)
0,0	3,40 a
2,7	6,53 a
5,4	3,07 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 9 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias dos números de gemas por explante de *Eucalyptus camaldulensis*, em função das concentrações de BAP

Concentrações de BAP (µM)	Gemas por explante (Nº)
0,00	0,067 b
4,44	10,000 a
13,32	2,930 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Foram ajustadas equações de regressão lineares para representar o número de gemas por explante em função das concentrações de ANA e BAP comparadas. Os gráficos que representam esta variável são apresentados nas figuras 14, 15 e 16.

Para as três concentrações de BAP na ausência de ANA (Figura 14), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = - 3,552 E^{-15} + 2,830 X - 0,191 X^2 (R^2 = 54,35\%)$$

onde: Y = número de gemas por explante

X = concentração de BAP (µM)

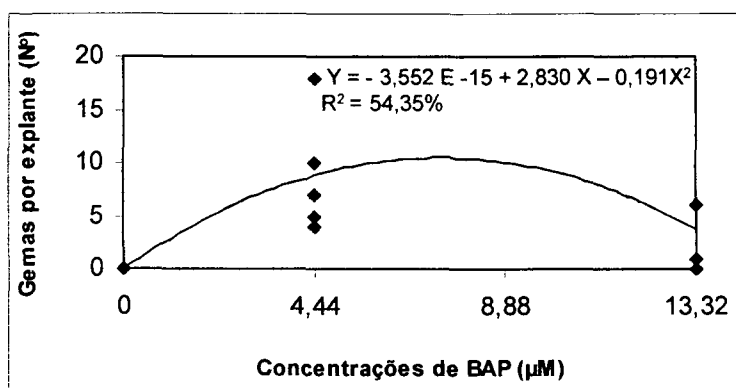


Figura 14 - Equação de regressão ajustada para o número de gemas por explante de *Eucalyptus camaldulensis* em função das três concentrações de BAP na ausência de ANA

Já para as três concentrações de BAP quando a concentração de 2,7 µM de ANA foi utilizada (Figura 15), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 1,0 + 4,08 X - 0,279 X^2 \quad (R^2 = 53,60\%)$$

onde: Y = número de gemas por explante

X = concentração de BAP (µM)

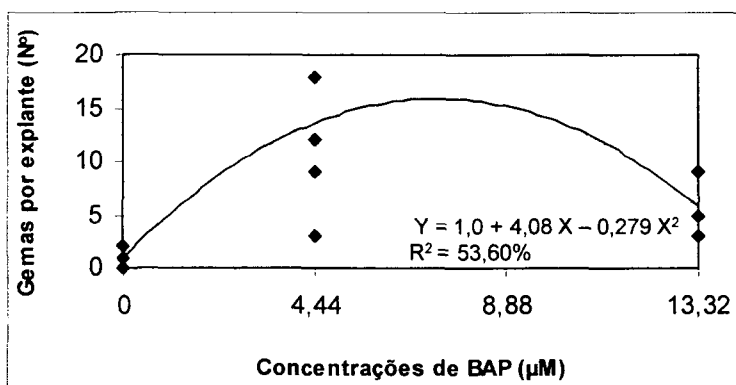


Figura 15 - Equação de regressão ajustada para o número de gemas por explante de *Eucalyptus camaldulensis* em função das três concentrações de BAP para 2,7 µM de ANA

Para as três concentrações de BAP e 5,4 µM de ANA (Figura 16), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 1,6 + 2,027 X - 0,152 X^2 \quad (R^2 = 51,81\%)$$

onde: Y = número de gemas por explante

X = concentração de BAP (μM)

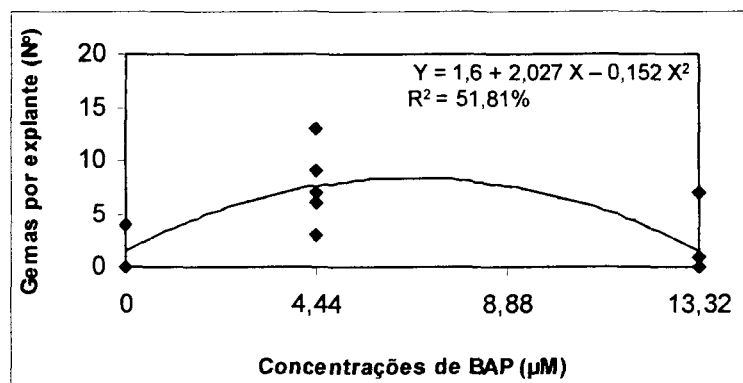


Figura 16 – Equação de regressão ajustada para o número de gemas por explante de *Eucalyptus camaldulensis* em função das três concentrações de BAP para 5,4 μM de ANA.

A combinação entre as concentrações de 2,7 μM de ANA e 4,44 μM de BAP apresentou-se adequada para as variáveis porcentagem de explantes regenerando gemas e número de gemas por explante. Estes resultados se distanciaram dos encontrados por HO et al. (1998) e DIALLO e DUHOUX (1984), que obtiveram sucesso na regeneração de gemas com o mesmo tipo de explante de *E. camaldulensis*, utilizando 16,2 μM de ANA com 4,44 μM de BAP e 5,4 μM de ANA com 2,22 μM de BAP, respectivamente. Estes autores utilizaram uma concentração de ANA superior à concentração de BAP. No caso presente, os melhores resultados foram obtidos com uma concentração de BAP superior à concentração de ANA.

Segundo TIBOK et al. (1995), estes resultados sugerem que as diferenças nas respostas de regeneração de gemas em um mesmo tipo de explante podem ser um reflexo da variação genotípica entre as sementes utilizadas para a obtenção dos explantes. Em nosso trabalho, o lote de sementes foi composto por sementes de diferentes árvores de *Eucalyptus camaldulensis*, fato este que resultou em uma mistura de genótipos.

Comparando os resultados encontrados nesta pesquisa aos de pesquisas similares relatados por GEORGE (1993), os nossos correspondem ao indicado. Estes autores afirmam que a indução de calos e regeneração de gemas requer um ajuste entre os níveis de auxinas e citocininas favorável às citocininas. Em outro estudo, BARRUETO CID et al. (1999) utilizaram folhas de *E. grandis* x *E. urophylla* com diferentes idades na tentativa de regenerar gemas. O meio de cultura utilizado foi o MS com concentração de sais reduzida a metade e a do FeEDTA reduzida a 1/4. Para a indução de calos, foi utilizado 20 μM do

regulador de crescimento TDZ durante 30 dias e para a indução de gemas 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA por mais 30 dias. A maior média de regeneração obtida foi encontrada por estes autores quando utilizaram explantes foliares de 30 e 40 dias (53%), superando os resultados encontrados com explantes de 20 e 50 dias (13%).

Para a variável porcentagem de explantes mortos, a análise de variância revelou que a interação entre os níveis de ANA e BAP foi estatisticamente significativa, indicando que os fatores não são independentes (Tabela 4). O teste de comparação de médias revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos na presença de ANA e BAP (Tabela 10). O resultado obtido no meio desprovido de ANA e contendo 4,44 μM de BAP não diferiu estatisticamente daquele obtido na presença de 13,32 μM de BAP (Tabela 10). Para a concentração de 2,7 μM de ANA, não houve diferenças estatísticas entre os resultados obtidos com as concentrações de BAP estudadas (Tabela 10). Para a concentração de 5,4 μM de ANA, a concentração de 4,44 μM de BAP foi responsável pela menor média de explantes mortos e a concentração 13,32 μM de BAP foi responsável pela morte de 50% dos explantes (Tabela 10), caracterizando a maior média de mortalidade observada em todos os níveis de fitorreguladores comparados nesta pesquisa.

TABELA 10 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias das porcentagens de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* mortos em função das concentrações de ANA e BAP.

BAP (μM)	ANA (μM)		
	0,00	2,7	5,4
0,00	0,00 b	38,20 a	33,40 ab
4,44	30,00 a	23,20 a	13,40 b
13,32	36,60 a	28,23 a	50,00 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A combinação de 5,4 μM de ANA com 13,32 μM de BAP foi responsável pela maior porcentagem de explantes mortos, apresentando média de 50% enquanto que a combinação entre 5,4 μM de ANA e 4,44 μM de BAP apresentou a menor taxa de mortalidade de explantes com média de 13,4% (Tabela 10). Segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), "altas concentrações de reguladores de crescimento nos meios de cultura, principalmente citocininas, favorecem a oxidação dos explantes. Este grupo de reguladores pode potencializar os efeitos oxidativos das culturas *in vitro*. Na tentativa de reduzir estes efeitos, deve-se utilizar meios de cultura mais diluídos e menores concentrações de citocininas".

Foram ajustadas equações de regressão lineares para representar a porcentagem média de explantes mortos em função das concentrações de ANA e BAP comparadas. Os gráficos que representam esta variável são apresentados nas figuras 17, 18 e 19.

Para as três concentrações de BAP e quando o ANA não foi adicionado (Figura 17), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = -2,131 \text{ E } -14 + 8,761 X - 0,451 X^2 \quad (R^2 = 51,21\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes mortos

X = concentração de BAP (μM)

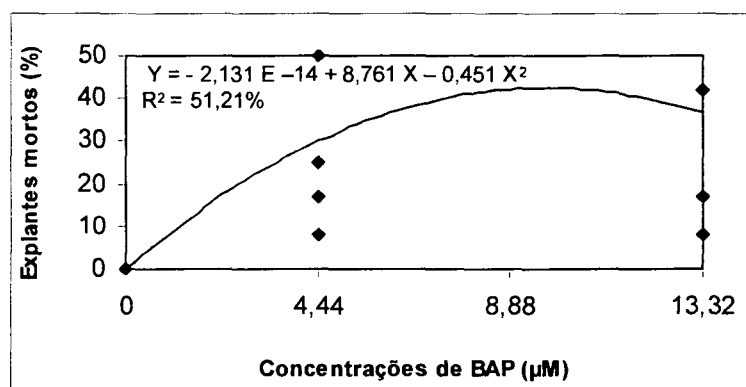


Figura 17 – Equação de regressão ajustada para o efeito das três concentrações de BAP na ausência de ANA na porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* mortos

Já para as três concentrações de BAP e 2,7 μM de ANA (Figura 18), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 38,2 - 4,692 X + 0,296 X^2 \quad (R^2 = 22,35\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes mortos

X = concentração de BAP (μM)

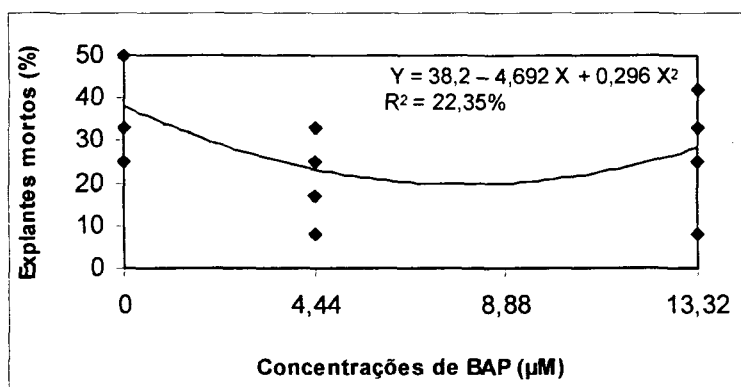


Figura 18 – Equação de regressão ajustada para o efeito das três concentrações de BAP quando 2,7 µM de ANA foi adicionado aos meios de cultura para a porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* mortos

Para as três concentrações de BAP e 5,4 µM de ANA (Figura 19), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 33,4 - 7,380 X + 0,647 X^2 \quad (R^2 = 65,56\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes mortos

X = concentração de BAP (µM)

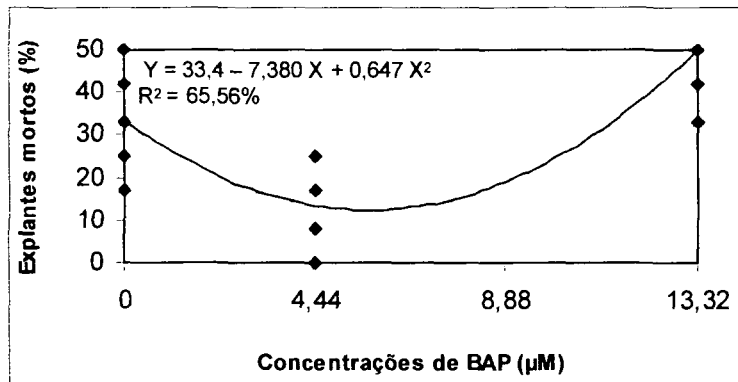


Figura 19 – Equação de regressão ajustada para o efeito das três concentrações de BAP e 5,4 µM de ANA na porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* mortos

No caso dos tratamentos com 2,7 e 5,4 µM de ANA, a calogênese ocorreu aos 15 dias após a inoculação dos explantes, e a predominância da coloração dos calos foi a marrom escura manifestada em todo o explante. Aos 30 dias, alguns explantes desenvolveram calos com coloração verde ou vermelha, muitos tricomas, e iniciaram a formação de raízes. Aos 45 dias ocorreu um intenso desenvolvimento dos calos de

coloração marrom. Aos 60 dias, constatou-se que estas concentrações de ANA induziam a formação de raízes. GEORGE (1993) afirma que a indução de raízes a partir de explantes ocorre freqüentemente quando utiliza-se meios de cultura suplementados somente com auxinas, ou quando o balanço entre auxinas e citocininas é favorável às auxinas.

Como resultado preliminar deste protocolo de regeneração de gemas adventícias a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*, ficou comprovado estatisticamente que a combinação entre as concentrações de 2,7 µM de ANA e 4,44 µM de BAP pode ser utilizada de forma eficiente para a regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*.

4.2.2 Efeito da ausência de luz na calogênese e regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*

Os resultados da análise de variância para a porcentagem de explantes com calos, porcentagem de explantes com gemas, número de gemas por explante e porcentagem de explantes mortos são apresentados na Tabela 11.

TABELA 11 - Resultados da análise de variância para a porcentagem de explantes formando calos, porcentagem de explantes regenerando gemas, número de gemas por explante e porcentagem de explantes mortos em *Eucalyptus camaldulensis*

FATOR DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO			
		Explantes com calos (%)	Explantes com gemas (%)	Gemas por explante (Nº)	Explantes mortos (%)
NF	2	197585,60**	466,20**	47,43**	472,30**
CONDIÇÃO	1	2167,50**	4061,06**	0,30 ^{ns}	821,63**
NF X CONDIÇÃO	2	606,90**	228,90 ^{ns}	3,10 ^{ns}	226,43**
ERRO	24	64,78	96,47	2,17	13,57
COEF. DE VARIAÇÃO (%)		21,39	43,14	50,50	77,65
TESTE DE BARTLETT		1,70 ^{ns}	1,05 ^{ns}	1,05 ^{ns}	1,17 ^{ns}

^{ns} não significativo

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

NF Níveis de fitorreguladores

A análise de variância revelou que a interação entre os níveis de fitorreguladores e a condição de cultivo (presença ou ausência de luz) foi estatisticamente significativa para a variável explantes com calos indicando que os fatores não são independentes (Tabela 11). Este resultado comprovou que para todos os níveis de fitorreguladores utilizados, exceto o controle, as maiores médias de explantes com calos foram obtidas nos tratamentos que permaneceram o período inicial de trinta dias no escuro embora não diferindo estatisticamente das médias obtidas nos tratamentos onde os explantes permaneceram os

60 dias de cultivo na presença de luz (Tabela 12). O tratamento inicial de 30 dias no escuro também foi benéfico para a iniciação e formação de calos a partir de folhas cotiledonares do híbrido *E. grandis* X *E. urophylla*, conforme resultados de GONZALES et al. (2002). WARRAG et al. (1991) verificaram também que o período de 4 semanas no escuro proporcionou resultados promissores na calogênese em *E. urophylla*. Nesse caso os explantes utilizados foram inflorescências imaturas, partes florais (filamentos dos estames e tecidos do ovário), embriões zigóticos e hipocótilos.

TABELA 12 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias entre os níveis de ANA combinados com 4,44 µM de BAP e a condição de cultivo nos primeiros 30 dias para a porcentagem de explantes com calos

Condição de cultivo	Níveis de ANA (µM)		
	0	2,7	5,4
Luz	0,00 b	58,4 a	69,8 a
Escuro	0,00 b	89,0 a	90,2 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

As cores dos calos formados nos explantes que permaneceram 60 dias na luz foram variadas e o local predominante de origem dos mesmos foi a base do pecíolo. Os calos formados nos explantes que permaneceram os 30 primeiros dias de cultivo no escuro eram claros, tendendo para a cor branca devido a ausência de fotossíntese neste período (Figura 28 A-B) e após o contato com a luz estes calos mudaram de coloração para vermelho, verde e marrom.

Foram ajustadas equações de regressão lineares para representar a porcentagem de explantes com calos em função das concentrações de ANA nas duas condições de cultivo comparadas. Os gráficos que representam esta variável são apresentados nas figuras 20 e 21.

Para as três concentrações de ANA onde os explantes permaneceram na presença de luz (Figura 20), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 7,10543 E^{-15} + 30,3333 X - 3,22359 X^2 \quad (R^2 = 98,39\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes formando calos

X = concentração de ANA (µM)

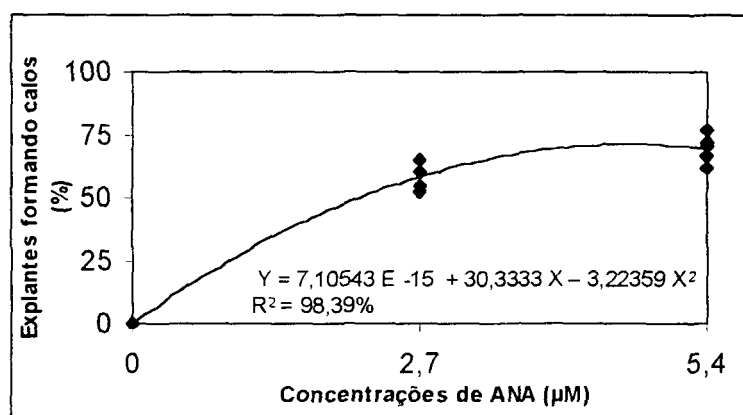


Figura 20 – Equação de regressão ajustada para a variável porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* com calos em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram na presença de luz durante 60 dias

Já para as três concentrações de ANA onde os explantes permaneceram os 30 primeiros dias de cultivo no escuro (Figura 21), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 7,10543 \text{ E } -15 + 49,0741 X - 5,96708 X^2 \quad (R^2 = 99,93\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes formando calos

X = concentração de ANA (µM)

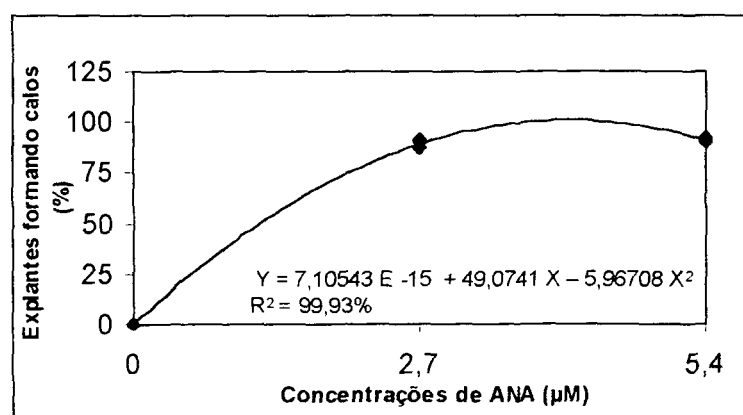


Figura 21 – Equação de regressão ajustada para a variável porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* com calos em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram os 30 primeiros dias de cultivo no escuro

Para a variável porcentagem de explantes regenerando gemas, a análise de variância revelou que a interação entre os níveis de fitorreguladores e a condição de cultivo não foi significativa, indicando que os fatores são independentes (Tabela 11). Os resultados dos testes de comparação de médias mostram que existem diferenças estatisticamente

significativas entre os níveis de fitorreguladores e o controle (Tabela 13) e que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as condições de cultivo (Tabela 14).

TABELA 13 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias entre os níveis de ANA combinados com 4,44 µM de BAP para a porcentagem de explantes regenerando gemas

Níveis de ANA (µM)	Explantes com gemas (%)
0	0,00 b
2,7	31,30 a
5,4	29,90 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 14 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias entre as condições de cultura para porcentagem de explantes regenerando gemas

Condição	Explantes com gemas (%)
Luz	16,40 a
Escuro	24,40 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Foram ajustadas equações de regressão lineares para representar a porcentagem de explantes regenerando gemas em função das concentrações de ANA nas duas condições de cultivo comparadas. Os gráficos que representam esta variável são apresentados nas figuras 22 e 23.

Para as três concentrações de ANA onde os explantes permaneceram 60 dias na presença de luz (Figura 22), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 2,4869 \text{ E } -14 + 17,3704 X - 2,51029 X^2 \text{ (R}^2 = 95,84\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes regenerando gemas

X = concentração de ANA (µM)

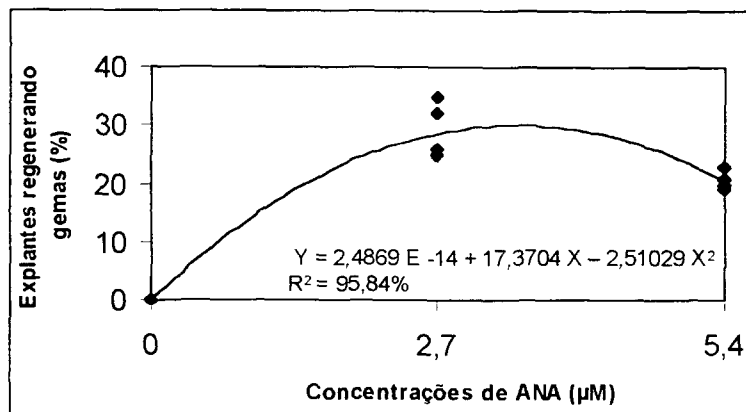


Figura 22 – Equação de regressão ajustada para a variável porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* regenerando gemas em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram os 60 dias de cultivo na presença de luz

Já para as três concentrações de ANA onde os explantes permaneceram os 30 primeiros dias de cultivo no escuro (Figura 23), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 2,4869 \text{ E } -14 + 17,9259 X - 1,97531 X^2 \quad (R^2 = 98,41\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes regenerando gemas

X = concentração de ANA (μM)

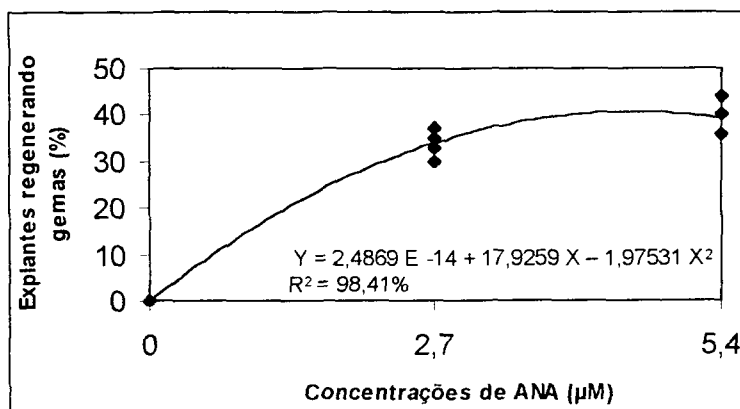


Figura 23 – Equação de regressão ajustada para a variável porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* regenerando gemas em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram os 30 primeiros dias de cultivo no escuro

A análise de variância revelou que a interação entre os níveis de fitorreguladores e as condições de cultura não foi significativa para a variável número de gemas por explante,

indicando que os fatores são independentes (Tabela 11). Os testes de comparação de médias revelaram que existem diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de fitorreguladores e o controle (Tabela 15) e que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as condições de cultivo estudadas (Tabela 16). O local predominante da formação das gemas foi a base do pecíolo.

TABELA 15 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias do número de gemas por explante em função dos níveis de ANA combinado com 4,44 µM de BAP

Níveis de ANA (µM)	Gemas por explante (Nº)
0	0,00 b
2,7	4,20 a
5,4	3,10 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 16 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias do número de gemas por explante em função das condições de cultivo

Condição	Gemas por explante (Nº)
Luz	2,33 a
Escuro	2,53 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Para as três concentrações de ANA onde os explantes permaneceram 60 dias na presença de luz (Figura 24), a equação de regressão ajustada foi

$$Y = 3,55271 \text{ E } -15 + 2,96296 X - 0,466392 X^2 \text{ (R}^2 = 95,66\%)$$

onde: Y = número de gemas por explante

X = concentração de ANA (µM)

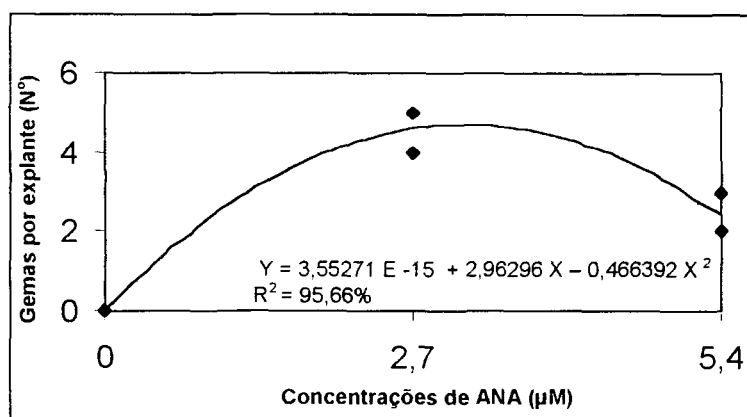


Figura 24 – Equação de regressão ajustada para a variável número de gemas de *Eucalyptus camaldulensis* por explante em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram os 60 dias de cultivo na presença de luz

Já para as três concentrações de ANA onde os explantes permaneceram os 30 primeiros dias no escuro (Figura 25), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 2,66454 \text{ E } -15 + 2,11111 X - 0,260631 X^2 \quad (R^2 = 89,57\%)$$

onde: Y = número de gemas por explante

X = concentração de ANA (µM)

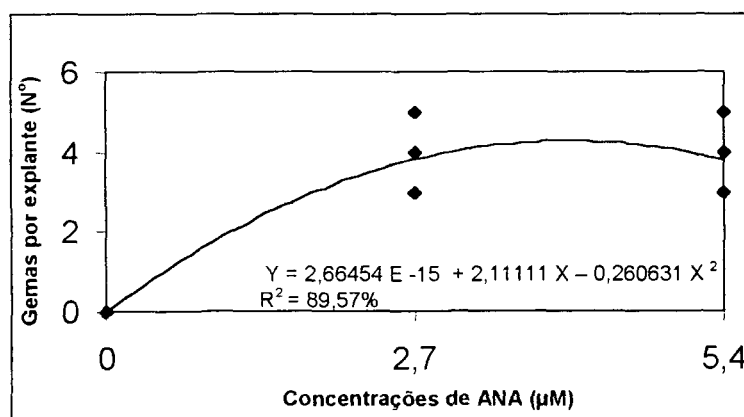


Figura 25 – Equação de regressão ajustada para a variável número de gemas de *Eucalyptus camaldulensis* por explante em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram os 30 primeiros dias de cultivo no escuro

Com relação à porcentagem de explantes mortos, ficou comprovado estatisticamente que os tratamentos que não receberam suplementação com reguladores de crescimento (controles na luz e no escuro) permitiram a sobrevivência de 100% dos explantes

observados (Tabela 17). A combinação entre as concentrações 2,7 µM de ANA e 4,44 µM de BAP aplicada aos explantes que permaneceram na luz diferiu estatisticamente da mesma combinação quando os explantes permaneceram no escuro, com valores de 17,6 e 4,8% respectivamente. O resultado observado com a combinação de 5,4 µM de ANA e 4,44 µM de BAP na luz diferiu estatisticamente daquele obtido com a mesma combinação de ANA e BAP e um tratamento de 30 dias no escuro, com valores de 21,8 e 3,2% respectivamente.

TABELA 17 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias das porcentagens de explantes mortos em função das concentrações de ANA e condições de cultivo

Condição	Níveis de ANA (µM)		
	0	2,7	5,4
Luz	0,00 a	17,6 a	21,8 a
Escuro	0,00 a	4,8 b	3,2 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Nossos resultados confirmam os obtidos por LAINÉ et al. (1994) quando estudaram o efeito do escuro na calogênese e regeneração a partir de folhas de *Eucalyptus grandis*. Estes autores evidenciaram que a ausência de luz proporciona um efeito benéfico durante o início das culturas *in vitro* para esta espécie, pois minimiza os efeitos negativos causados pela liberação de compostos fenólicos e consequentemente diminui a mortalidade entre os explantes, mesmo sem a utilização de PVP ou outros antioxidantes. A porcentagem de calos com gemas obtida por estes autores após o período inicial de cultivo no escuro e posterior exposição à luz foi elevada (38,5%) quando comparada à média de regeneração obtida com o tratamento que utilizou exposição à luz (7,1%).

Foram ajustadas equações de regressão lineares para representar a porcentagem de explantes mortos em função das concentrações de ANA nas duas condições de cultivo comparadas. Os gráficos que representam esta variável são apresentados nas figuras 26 e 27.

Para as três concentrações de ANA onde os explantes permaneceram 60 dias na presença de luz (Figura 26), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 1,24345 E -14 + 9,0X - 0,919067 X^2 (R^2 = 99,11\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes mortos

X = concentração de ANA (µM)

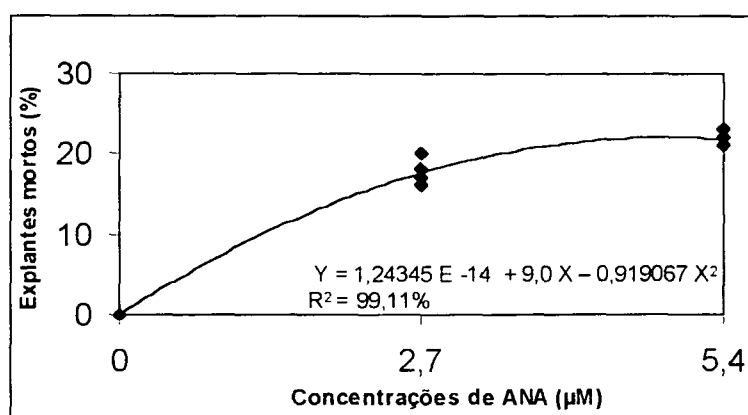


Figura 26 – Equação de regressão ajustada para a variável porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* mortos em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram os 60 dias de cultivo na presença de luz

Já para as três concentrações de ANA onde os explantes permaneceram os 30 primeiros dias no escuro (Figura 27), a equação de regressão ajustada foi:

$$Y = 3,55271 \text{ E } -15 + 2,96296 X - 0,438957 X^2 \quad (R^2 = 71,68\%)$$

onde: Y = porcentagem de explantes mortos

X = concentração de ANA (µM)

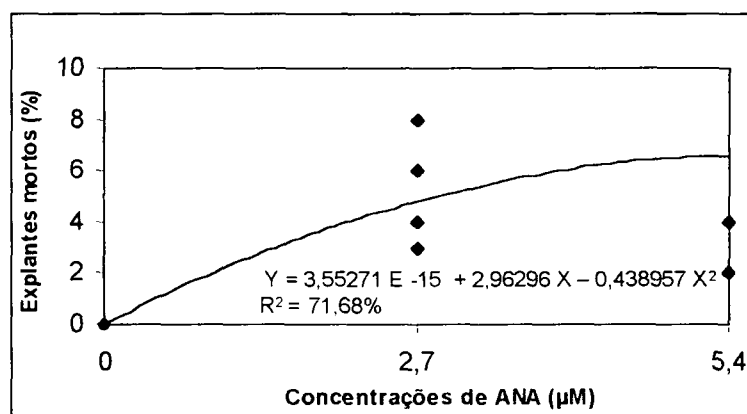


Figura 27 – Equação de regressão ajustada para a variável porcentagem de explantes de *Eucalyptus camaldulensis* mortos em função das três concentrações de ANA quando os explantes permaneceram os 30 primeiros dias de cultivo no escuro

Como resultado desta otimização do protocolo de regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*, ficou comprovado estatisticamente que a ausência de luz nos primeiros 30 dias de cultivo representa uma importante estratégia para aumentar o potencial regenerativo, pois atua decisivamente no aumento da calogênese e

próximos experimentos de indução de calos e regeneração de gemas pelo fato de não desenvolver de forma excessiva calos nas folhas das plântulas, ocorrência esta que interfere negativamente no futuro desenvolvimento das mesmas.

4.2.3 Efeito das modificações do meio de cultura MS na calogênese e regeneração a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*

A análise de variância (Tabela 18) revelou que as diferenças entre os tratamentos não foram significativas para as variáveis porcentagem de explantes com calos, porcentagem de explantes regenerando gemas, número de gemas por explante e significativas para a porcentagem de explantes mortos (Tabelas 18 e 19).

TABELA 18 - Resultados da análise de variância para a porcentagem de explantes formando calos, porcentagem de explantes regenerando gemas, número de gemas por explante e porcentagem de explantes mortos em *Eucalyptus camaldulensis*

FATOR DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO			
		Explantes com calos (%)	Explantes com gemas (%)	Gemas por explante (Nº)	Explantes mortos (%)
TRATAMENTOS	3	175,09 ^{ns}	94,19 ^{ns}	31,67 ^{ns}	81,29**
ERRO	16	87,94	94,12	12,50	14,39
COEF. DE VARIAÇÃO (%)		19,92	19,81	41,48	72,87
TESTE DE BARTLETT		1,57 ^{ns}	1,49 ^{ns}	1,17 ^{ns}	1,78 ^{ns}

^{ns} não significativo

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 19 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias das variáveis porcentagem de folhas cotiledonares com calos, porcentagem de explantes regenerando gemas, número de gemas por explante e porcentagem de explantes mortos em *Eucalyptus camaldulensis*

Tratamentos	Porcentagem média de explantes com calos	Porcentagem média de explantes com gemas	Número médio de gemas por explante	Porcentagem média de explantes mortos
(1) MS (Controle)	86,68 a	46,68 a	13,00 a	8,34 ab
(2) MS 1/2 Macro e Micro	87,78 a	54,08 a	9,00 a	2,40 b
(3) MS 1/2 Nitratos	97,50 a	44,30 a	9,00 a	5,00 ab
(4) MS 1/2 Macronutrientes	97,40 a	50,80 a	7,00 a	11,68 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O resultado do teste de comparação de médias mostra que para a variável porcentagem de explantes com calos, todos os tratamentos foram eficientes e não diferiram estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Este resultado sugere que as modificações da composição salina dos meios aqui testadas não exercem influência na calogênese em folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*, sendo o balanço entre ANA e BAP o fator primordial para esta etapa do desenvolvimento *in vitro* da espécie. A maior porcentagem de explantes com calos (97,5%) foi obtida utilizando o meio de cultura com a concentração de nitratos reduzida a metade (Tabela 19). Os calos formados com este tratamento apresentaram-se claros, tendendo para a cor branca (Figura 28 A-B). Após o contato com a luz, houve alterações para as cores verde, vermelha e marrom.

Quanto à variável porcentagem média de explantes regenerando gemas, todos os tratamentos foram eficientes e não apresentaram diferenças estatísticas (Tabela 19). A maior porcentagem de explantes regenerando gemas foi obtida com o meio de cultura MS com a concentração de sais reduzida à metade (54,08%). O local predominante de origem das gemas foi a base do pecíolo.

Para a variável número médio de gemas por explante, o teste de comparação das médias também não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. O tratamento que propiciou o maior número médio de gemas por explante (13,0) foi o MS completo (Tabela 19).

Com relação à porcentagem de explantes mortos, o teste de comparação de médias comprovou estatisticamente que os tratamentos comparados apresentaram diferenças significativas entre si, sendo o tratamento MS com a concentração de macronutrientes reduzida à metade responsável pela maior média (11,68%). A menor média de mortalidade (2,4%) foi obtida com o meio de cultura MS com a concentração de sais reduzidas a metade (Tabela 19). Este resultado sugere que a mortalidade dos explantes pode ser potencializada utilizando-se altas concentrações de sais no meio de cultura. Em alguns trabalhos com eucalipto foram descritas algumas informações sobre a composição mineral do meio de cultura e possíveis relações com a mortalidade de explantes. GEORGE (1993) indica que a indução de calos e regeneração de gemas a partir explantes de eucaliptos, podem ser obtidas com sucesso mediante a utilização dos meios de cultura MS completo e 1/2 MS. Já VALÉRIO et al. (2003) descreveram um protocolo de regeneração de gemas de *Eucalyptus camaldulensis* a partir de folhas jovens utilizando o meio de cultura LS (Linsmaier & Skoog, 1965) que também apresenta reduções nas concentrações de sais minerais. Já para a espécie *Eucalyptus globulus*, MORALEJO et al (1998) utilizaram para a regeneração de

gemas o meio de cultura Woody Plant Medium (WPM), que também apresenta reduções na maioria dos componentes minerais quando comparado ao meio MS.

4.2.4 Efeito do tempo de permanência dos explantes em meio de cultura MS na calogênese e regeneração a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*

A análise de variância revelou que as diferenças entre os tratamentos não foram significativas para a variável porcentagem de explantes com calos e significativos para a porcentagem de explantes regenerando gemas, número de gemas por explante e porcentagem de explantes mortos (Tabela 20).

TABELA 20 - Resultados da análise de variância para a porcentagem de explantes formando calos, porcentagem de explantes regenerando gemas, número de gemas por explante e porcentagem de explantes mortos em *Eucalyptus camaldulensis*.

FATOR DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO			
		Explantes com calos (%)	Explantes com gemas (%)	Gemas por explante (Nº)	Explantes mortos (%)
TRATAMENTOS	2	5,16 ^{ns}	525,12 *	68,47 **	671,87**
ERRO	12	1,94	119,50	5,07	33,38
COEF. DE VARIAÇÃO (%)		1,56	21,47	39,94	89,07
TESTE DE BARTLETT		-	1,06 ^{ns}	1,73 ^{ns}	2,37 ^{ns}

^{ns} não significativo

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

Para a variável porcentagem de explantes que formaram calos, o teste de comparação de médias mostrou que todos os tratamentos apresentaram eficiência nos resultados e não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 20). Quanto à variável porcentagem de explantes regenerando gemas, o teste de comparação de médias comprovou que o tratamento realizado com a troca de meio de cultura aos 30 dias sem adição de reguladores de crescimento propiciou uma média de 51,50%, superando a média de 31,60% obtida com a utilização do tratamento onde os explantes permaneceram 60 dias no mesmo meio de cultura (Tabela 21).

TABELA 21 - Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias das variáveis porcentagem de explantes com calos, porcentagem de explantes regenerando gemas, número de gemas por explante e porcentagem de explantes mortos em *Eucalyptus camaldulensis*.

Tratamentos	Explantes com calos (%)	Explantes com gemas (%)	Gemas por explante (Nº)	Explantes mortos (%)
Troca para mesmo meio contendo fitorreguladores	98,24 a	45,80 ab	11,80 a	5,56 b
60 dias no mesmo meio contendo fitorreguladores	100,0 a	31,60 b	4,40 b	24,10 a
Troca para meio isento de fitorreguladores	100,0 a	51,50 a	8,20 ab	3,20 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para a variável número de gemas por explante, o teste de comparação de médias revelou que os explantes que receberam a troca de meio de cultura aos 30 dias com adição de reguladores de crescimento regeneraram o maior número de gemas por explante (11,8), diferindo estatisticamente do tratamento onde os explantes permaneceram 60 dias no mesmo meio de cultura (4,40) (Tabela 21).

Com relação à porcentagem de explantes mortos, o teste de comparação de médias comprovou que os explantes que receberam troca de meio de cultura aos 30 dias sem adição de fitorreguladores e troca de meio de cultura aos 30 dias com adição de fitorreguladores tiveram as menores médias, 3,2% e 5,56% respectivamente (Tabela 21). A maior porcentagem de explantes mortos ocorreu utilizando-se o tratamento no qual os explantes permaneceram 60 dias no mesmo meio de cultura contendo fitorreguladores, com média de 24,10% (Tabela 21). Esta alta taxa de mortalidade provavelmente ocorreu devido à alta concentração de compostos fenólicos que foram exsudados pelos explantes durante o cultivo em um mesmo meio de cultura. Se considerarmos que a menor taxa de mortalidade foi observada no tratamento onde foi realizada a troca aos 30 dias para o meio de cultura isento de fitorreguladores, podemos concluir que existem dois fatores responsáveis pela alta mortalidade dos explantes. Um destes fatores é a ação oxidativa exercida provavelmente devida a alta concentração de fitorreguladores utilizados e o segundo fator seria a ação deletéria dos compostos fenólicos exsudados pelos explantes. Associando estes argumentos com os resultados obtidos, podemos concluir que a troca de meio de cultura aos trinta dias é uma prática de relevante importância para a manutenção dos calos e posterior indução e desenvolvimento das gemas adventícias.

4.3 Testes de alongamento e enraizamento

Quando os explantes foram transferidos para o meio de cultura MS sem carvão ativado, o resultado observado distanciou-se do esperado, pois as plântulas provenientes dos 2 tratamentos apresentaram-se cloróticas e o alongamento não foi uniforme (Figura 29 A). Foi observada também a exsudação de compostos fenólicos pelos calos no meio de cultura. As plântulas provenientes do tratamento 8 (5,4 μM de ANA + 4,44 μM de BAP) desenvolveram forte calogênese nas folhas, possivelmente devido ao efeito dos fitorreguladores do meio anterior. As respostas encontradas neste teste podem ser explicadas com base nas indicações de GEORGE (1993). Este autor enfatiza que no início da cultura, quando as gemas ainda não podem ser separadas dos explantes, ocorre a liberação de compostos fenólicos no meio de cultura, fato este que dificulta o desenvolvimento das plântulas. Este mesmo autor evidencia que a suplementação com PVP nas concentrações de 0,5 a 1 g.L^{-1} pode resolver este problema. Outro procedimento eficaz para amenizar estes efeitos, é a manutenção dos explantes no escuro durante 5 dias. Após este período, os explantes podem ser incubados na presença de luz.

No segundo experimento de alongamento, no qual foi utilizado o meio de cultura MS com a concentração de nitratos de potássio e amônio reduzida à metade e 2% de carvão ativado, as avaliações foram realizadas aos 60 dias após a inoculação com base na observação visual dos explantes. Apesar das plântulas não desenvolverem clorose nas folhas, o alongamento permaneceu desuniforme. As plântulas provenientes do tratamento 5 (2,7 μM de ANA + 4,44 μM de BAP) tiveram alturas variando de 1,0 a 8,0 cm, folhas de coloração verde escura, calogênese moderada nas folhas (Figura 29 B). As plântulas provenientes do tratamento 8 (5,4 μM de ANA + 4,44 μM de BAP) apresentaram alturas um pouco inferiores ao tratamento anterior, com valores compreendidos entre 0,5 e 7 cm, folhas verde escura com menor intensidade de calogênese quando comparada ao tratamento anterior e pôde-se constatar que este fato impediu o desenvolvimento das plântulas. As médias observadas foram de 3 raízes por planta medindo 6 cm de comprimento e, com o tratamento 5 (2,7 μM de ANA + 4,44 μM de BAP) foram observadas um número médio de 8 raízes com 10 cm de comprimento médio. Estes resultados confirmam os obtidos por GUPTA et al. (1983). Estes autores constataram em suas pesquisas de cultura *in vitro* de eucalipto que o carvão ativado possui um efeito estimulador do enraizamento.

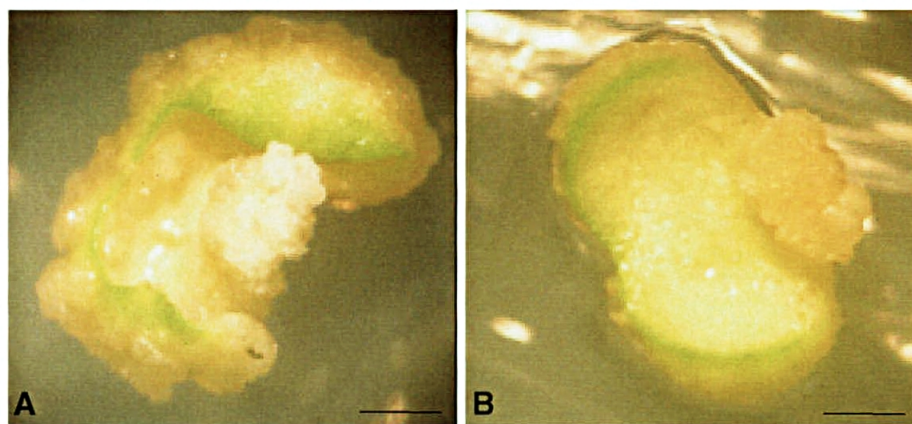


Figura 28 - Efeito do escuro na calogênese em folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*. (A) e (B) Calos brancos formados no limbo foliar e base do pecíolo 30 dias após a inoculação em meio de cultura MS com $2,7 \mu\text{M}$ de ANA + $4,44 \mu\text{M}$ de BAP. Barra, 2,5 mm.

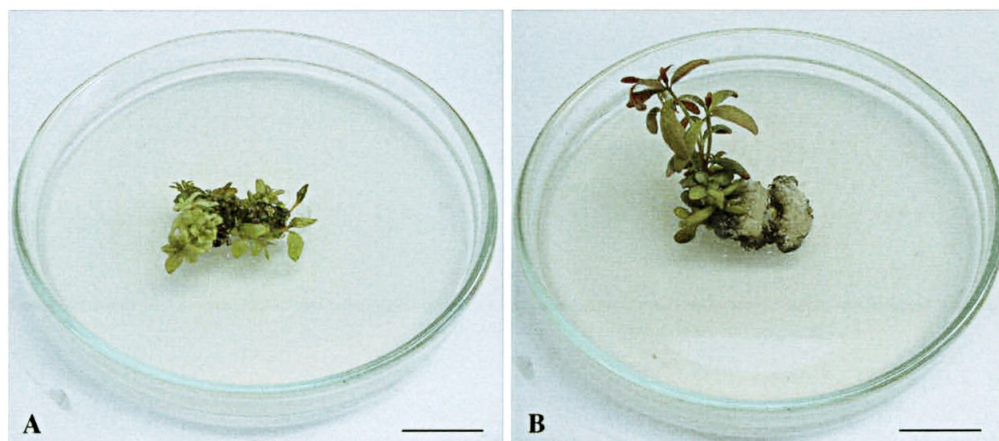


Figura 29 - Indução de alongamento em gemas de *Eucalyptus camaldulensis* provenientes do meio de cultura MS contendo $2,7 \mu\text{M}$ ANA e $4,44 \mu\text{M}$ BAP. (A) Alongamento após 30 dias na presença do meio de cultura MS completo sem carvão ativado. (B) Alongamento após 30 dias na presença do meio de cultura MS com a concentração de nitratos de potássio e amônio reduzida à metade e 2% de carvão ativado. Barra = 8 mm.

Segundo RODRIGUES e VENDRAME (2003), a eficiência da micropropagação de eucaliptos é altamente influenciada pelo equilíbrio iônico do meio de cultura. Segundo estes autores, estudos baseados nas informações obtidas na literatura e características nutricionais de plantas jovens de *Eucalyptus grandis*, foram decisivos para a formulação do meio de cultura JADS (CORREIA, 1993, CORREIA et al., 1995). Este meio específico para eucaliptos foi formulado com reduções significativas da maioria dos componentes em relação ao meio de cultura MS e assegura níveis adequados de nutrientes para o desenvolvimento das plantas. Em outro trabalho, TOURNIER et al. (2003) desenvolveram meios de cultura com balanços nutricionais diferenciados para cada fase da regeneração a partir de explantes de *E. grandis* x *E. urophylla*, e obtiveram resultados significativos para a otimização do protocolo.

Com base nos resultados e informações obtidas, conclui-se que a utilização do meio de cultura MS com a concentração de nitratos de potássio e amônio reduzida à metade e adição de 2% de carvão ativado, resulta em um procedimento simples, eficiente e prático para o alongamento e enraizamento de brotos de *Eucalyptus camaldulensis*. Este meio de cultura apresenta a vantagem de dispensar a adição de fitorreguladores e de não necessitar transferência para meios de cultura diferentes para estas duas etapas do desenvolvimento das mudas.

4.4 Estudo histológico dos explantes em fase regenerativa

A secção transversal de uma folha cotiledonar cultivada em meio de cultura sem reguladores de crescimento (controle) apresentou epiderme unisseriada com paredes delgadas e presença de estômatos nas duas faces. O mesofilo foliar exibiu organização dorsiventral com cerca de três camadas de parênquima paliçádico. Os feixes vasculares são colaterais e circundados por bainha parenquimática (Figura 30 A). Células contendo compostos fenólicos foram observadas principalmente no parênquima clorofiliano (Figura 30 B). Segundo CASTRO e MACHADO (2003), as substâncias fenólicas constituem uma classe de compostos do metabolismo secundário. A presença de compostos fenólicos em diversas famílias vegetais, incluindo as *Myrtaceae*, está relacionada com os mecanismos de interação entre plantas e animais. Em situações de estresse hídrico, os compostos fenólicos acumulados nos vacúolos garantem a manutenção das células e a integridade dos tecidos.

As secções transversais das folhas cotiledonares, em sucessivos estágios do desenvolvimento dos calos, mostraram que as células do parênquima paliçádico apresentam características meristemáticas, sendo que o início das divisões celulares é

periférico, sob a epiderme da face adaxial (Figura 30 B-C). À medida que a intensa divisão celular promove o crescimento do calo, as células da epiderme adaxial se rompem formando protuberâncias (Figura 30 D-F). O conhecimento do local exato do início das divisões celulares que antecedem a formação das protuberâncias, representa uma informação de grande interesse para os estudos de transformação genética uma vez que indica a origem superficial da iniciação das gemas adventícias.

Em outro estudo, TAKEMORI et al. (2000) utilizaram os reguladores de crescimento 4-CPPU e 2,4-D em meio de cultura MS com o objetivo de induzir a regeneração de brotos adventícios em cotilédones de *Racosperma mangium*. Em posterior estudo histológico, concluíram que a maior diferenciação das células meristemáticas ocorria próximo à epiderme.

Resultados similares foram encontrados por STIPP et al. (2001). Estes pesquisadores induziram gemas em cotilédones de *Cucurbita melo L. var. Inodorus* mediante a utilização de meio de cultura MS suplementado com 4,44 μM de BAP. O estudo histológico permitiu a observação da iniciação de numerosas regiões meristemáticas nos explantes. Os cortes revelaram a formação de várias protuberâncias na superfície dos explantes junto à epiderme, estando de acordo com nossas observações.

Em fase adiantada de desenvolvimento, os calos exibem grupos concêntricos de células vasculares e, em alguns explantes, observa-se o início da formação de ápices meristemáticos caulinares (Figura 31 A) e de algumas gemas adventícias apresentando primórdios foliares, ápice meristemático e procâmbio (Figura 31 B-F). Em alguns cortes foi possível visualizar o procâmbio estabelecendo conexão com o tecido do calo, evidenciando a regeneração adventícia indireta (Figura 31 E-F). Resultados similares foram encontrados por HERVÉ et al. (2001), quando realizaram estudos histológicos de explantes foliares, nodais e internodais de *Eucalyptus gunnii* em diferentes estágios regenerativos mediante utilização do meio de cultura MS suplementado com Picloram e BAP nas concentrações de 0,04 e 2,25 μM respectivamente. Estes autores constataram que as protuberâncias formadas nos explantes exibiam estruturas celulares bem organizadas e que as gemas regeneradas estavam sendo formadas na superfície destas protuberâncias, caracterizando também a organogênese indireta para esta espécie.

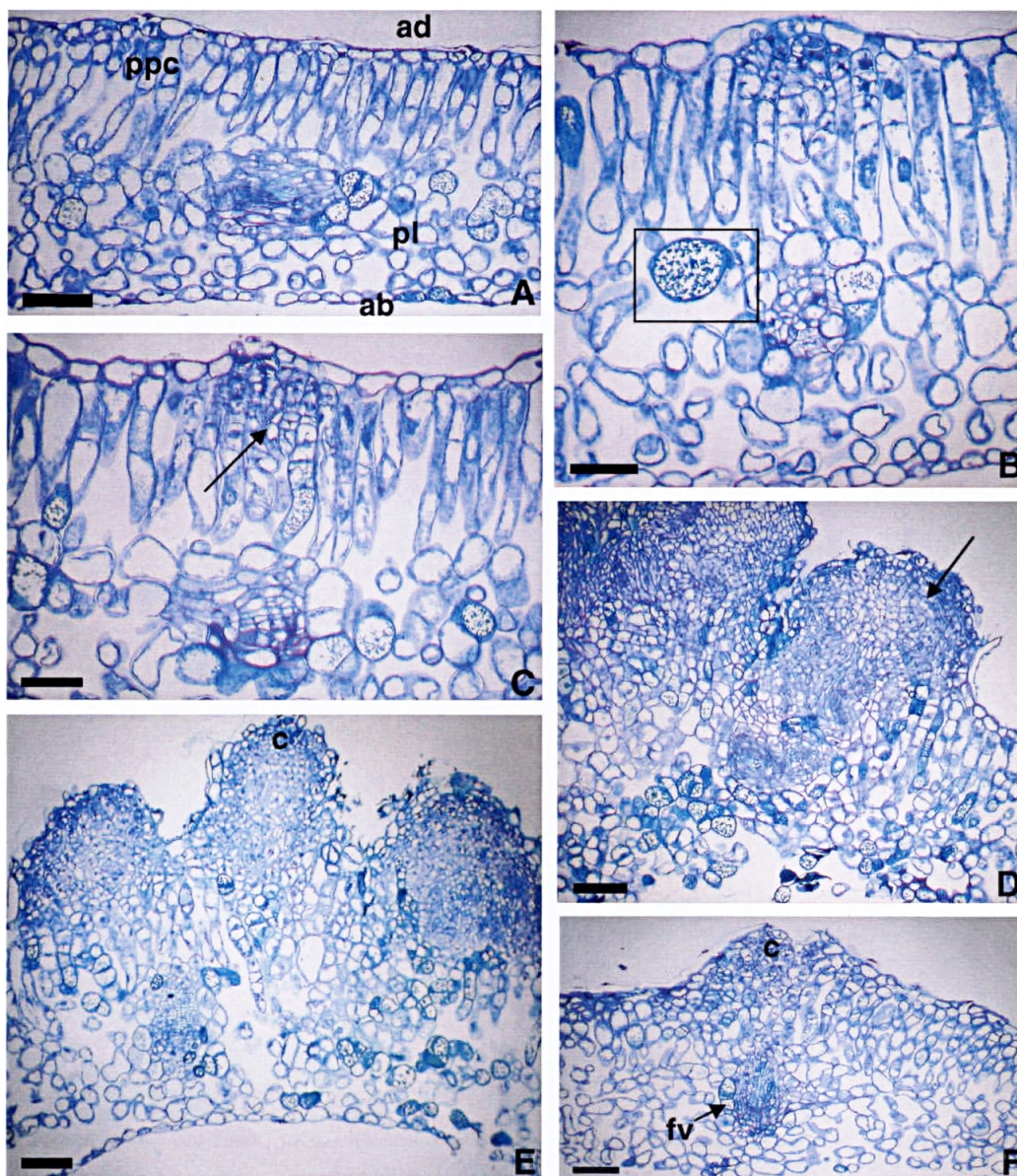


FIGURA 30 - Estágios sucessivos da calogênese em folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis* em secções transversais (A) (controle). (B) Célula do parênquima lacunoso contendo compostos fenólicos. (C-F) Diferentes estágios do desenvolvimento dos calos em folhas cotiledonares tratadas com fitorreguladores. (ad) face adaxial, (ab) face abaxial, (ppc) parênquima paliádico clorofiliano, (pl) parênquima lacunoso, (□) célula contendo compostos fenólicos, (seta) núcleo meristemático, (c) calo, (fv) feixe vascular. Barra = 100 µm.

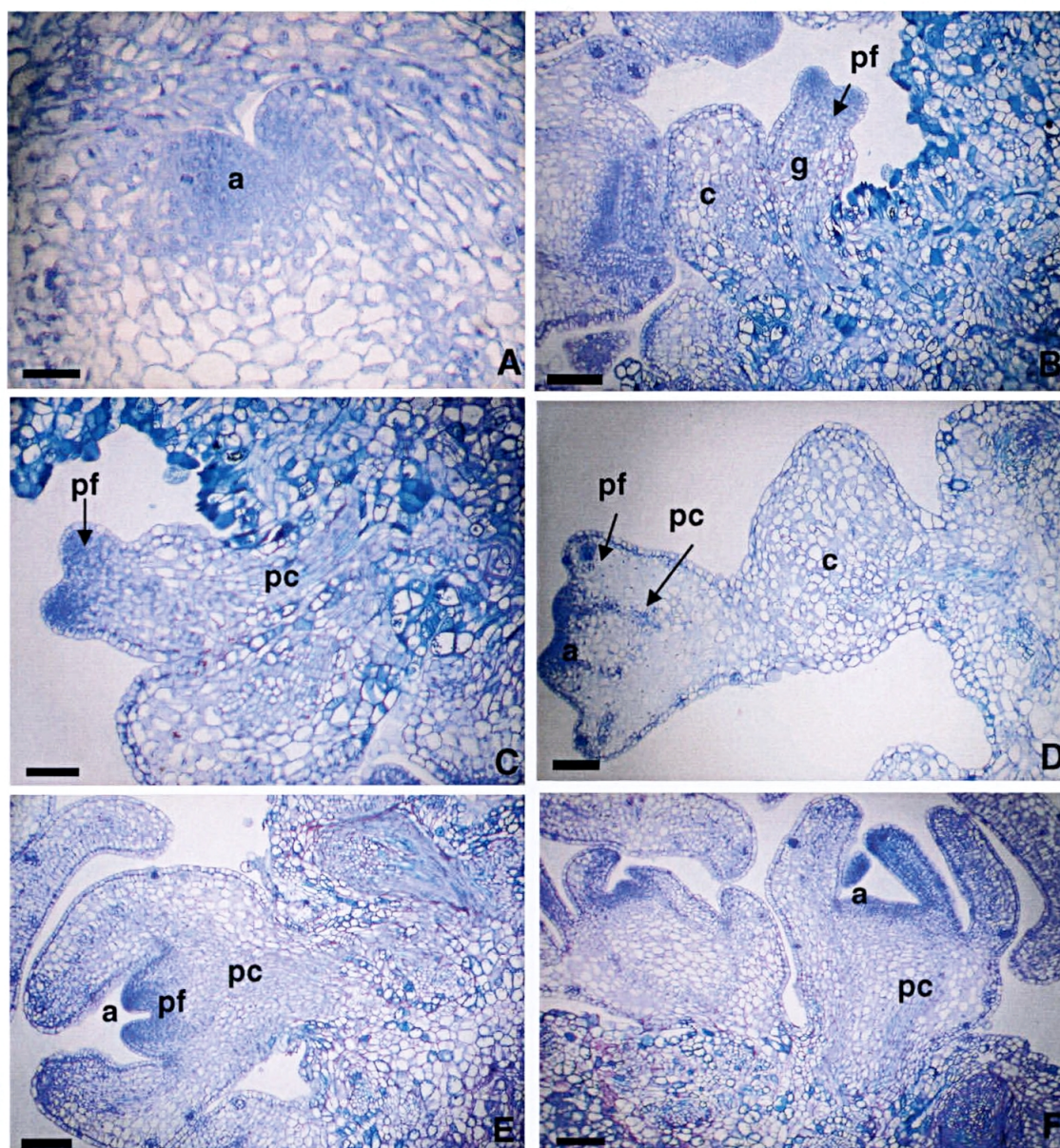


FIGURA 31 - Estágios sucessivos da organogênese em folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis* seccionados transversalmente. (A) Início da formação de um ápice meristemático caulinar. (B) Gema em vista longitudinal. (g). (C) Detalhe da figura (B). Gema em vista longitudinal. (E) Gema caulinar evidenciando conexão com o tecido do calo. (F) Gemas caulinhas em estágio avançado de desenvolvimento e procâmbio (seta) estabelecendo conexão com o tecido do calo. (a) ápice meristemático caulinar, (c) calo, (g) gema, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar. (A) Barra = 50 μ m. (C, D, E, F) Barra = 100 μ m.

4.5 Protocolo de regeneração de plantas de *Eucalyptus camaldulensis* a partir das folhas cotiledonares definido nesta pesquisa:

- Seleção das sementes utilizando uma peneira com malha capaz de reter somente as maiores;
- Desinfestação das sementes com um pré-tratamento utilizando etanol 70% durante 2 minutos e tratamento com hipoclorito de sódio 6% + 5 gotas de TWEEN – 20/100mL, agitando a solução contendo as sementes durante 20 minutos. Finalmente as sementes devem receber enxágüe triplo com água deionizada autoclavada;
- Após a técnica de desinfestação das sementes, as mesmas devem ser semeadas em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS com o auxílio de palitos estéreis;
- Quinze dias após a semeadura, as folhas cotiledonares devem ser isoladas com a face adaxial em contato no meio de cultura MS com a concentração completa e sais contendo 2,7 μ M de ANA combinado com 4,44 μ M de BAP. Os explantes devem permanecer no escuro durante os trinta primeiros dias de cultivo. Após este período, os explantes devem ser transferidos para o meio de cultura MS contendo a mesma combinação de fitorreguladores e permanecer em contato com a luz fluorescente branca fria por mais trinta dias;
- Após o período de regeneração que compreendeu 60 dias de cultivo, os explantes regenerando gemas devem receber uma limpeza para que o excesso de calos seja retirado. Em seguida transferidos para o meio de cultura MS isento de fitorreguladores com a concentração de nitratos de potássio e amônio reduzida à metade acrescido de 2% de carvão ativado por trinta dias. Após este período os brotos apresentarão alongamento e poderão ser repicados para o mesmo meio para que iniciem o enraizamento;
- Para a multiplicação das plantas regeneradas pode-se utilizar o mesmo meio de cultura desenvolvido para o alongamento. Segmentos nodais podem ser divididos e isolados para acelerar a multiplicação do material de elite;

5 CONCLUSÕES

- A desinfestação das sementes de *Eucalyptus camaldulensis* revelou-se simples, e seu sucesso depende diretamente da adequação do processo para cada lote de sementes utilizado;
- O balanço entre os reguladores de crescimento, ANA e BAP é o fator mais importante para o sucesso na regeneração de gemas a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*. Sugere-se que em futuros estudos, sejam comparadas as melhores concentrações apresentadas neste trabalho para as etapas de calogênese e regeneração. Outra alternativa interessante seria a utilização de concentrações mais diluídas dos reguladores de crescimento que apresentaram eficiência nesta pesquisa;
- Reduções na composição mineral não interferem significativamente na regeneração de gemas e tampouco determinam um fator de redução de custos, pois os componentes do meio de cultura que oneram as pesquisas são os fitorreguladores e os agentes gelatinizantes;
- A redução dos nitratos e nitritos das soluções do meio de cultura MS demonstrou ser um procedimento indispensável para o sucesso no alongamento das gemas regeneradas a partir das folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*;
- O carvão ativado apresentou eficiência no enraizamento de micro-estacas de *Eucalyptus camaldulensis*, dispensando a utilização de reguladores do crescimento. Sugere-se que em futuros estudos sejam desenvolvidos delineamentos experimentais compostos por tratamentos que comparem reduções na composição mineral do meio na presença e ausência de diferentes concentrações de carvão ativado.
- Para a multiplicação do material vegetal sugere-se que sejam desenvolvidos estudos utilizando tratamentos com meios de cultura contendo concentrações de BAP com o

intuito de maximizar a multiplicação e conseqüentemente acelerar o processo de produção das mudas;

- Estudos de aclimação são de importância fundamental para a obtenção de um protocolo e regeneração de plantas de *Eucalyptus camaldulensis* bem definido. Sugere-se que seja desenvolvido um trabalho de pesquisa que atenda este objetivo. Algumas composições de substratos e condições de cultivo poderiam ser estudadas.
- O estudo histológico desenvolvido nesta pesquisa terá importância particular para os estudos de transformação genética da espécie, pois ficou comprovado a origem indireta das gemas adventícias e o local exato das divisões celulares que antecede a formação dos meristemas;

6 REFERÊNCIAS

AREZKI, O.; BOXUS, P.; KEVERS, C.; GASPAR, T. Hormonal control of proliferation in meristematic agglomerates of *Eucalyptus camaldulensis* DEHN. **In Vitro Cellular Development Biology Plant**. v. 36, p.398-401, 2000.

ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 186, 1997.

BARRUETO CID, L. P.; MACHADO, A. C. M.; CARVALHEIRA, S. R. C.; BRASILEIRO, A. C. M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 56, p. 17 - 23, 1999.

BOULAY, M. Aspects pratiques de la multiplication *in vitro* des essences forestières. **Annales de Recherches Sylvicoles. AFOCEL**, p. 7-43, 1984.

CASTRO, M. M.; MACHADO, S. R. Células e tecidos secretores. *In*: Appezzato, B.; Carmello-Guerreiro, S. M. **Anatomia Vegetal**. Editora UFV, v.1, p.186, 2003.

CHEN, Z.; EVANS, D. A. Handbook of plant cell culture. **Perennial Crops**, v. 6, p. 190 – 215, 1990.

CORREIA, D. Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus spp* em meio de cultura líquido e sólido. **Dissertação de Mestrado**. ESALQ - USP, Piracicaba, p. 113, 1993.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. T. Z. do.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, v. 48/49, p. 107 - 116, 1995.

DIALLO, N.; DUHOUX, E. Organogenèse et multiplication "*in vitro*" chez l' *Eucalyptus camaldulensis*. **Journal Plant Physiology** v.115, p. 177 – 182, 1984.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p. 123 - 142. 1968.

FERREIRA, M. **Escolha das espécies de eucaliptos**. Circular técnica IPEF, v.47, p.1-30, 1979. Disponível em: <<http://www.ipef.com.br/especies/desceucaliptos.html>> Acesso em 05 set. 2001.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requeriments of suspension cultures of soybean root cells. **Expt. Cell Research**, v. 50, p. 151 - 158, 1968.

- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**, 2. Ed. Edington: Exegetics, 1.v, p. 214 - 215, 1993.
- GONZÁLES, E. R.; ANDRADE, A.; BERTOLO, A. L.; LACERDA, G.C.; CARNEIRO, R. T.; DEFÁVARI, V.; VENEZIANO LABATE, M.; LABATE, C. A. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* using the sonifucation-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. **Funct. Plant Biology**, v.29, p. 97 - 102, 2002.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. *In*: Torres, A. C.; Caldas, L. S. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v. 1, p. 143 - 183, 1998.
- GUPTA, P. K.; MEHTA, U. J. & MASCARENHAS. A tissue culture method for rapid clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus torelliana* and *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, v. 2, p. 296 - 299, 1993.
- HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J. N.; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, v. 161, p. 645 - 653, 2001.
- HO, C. K.; CHANG, S. H.; TSAY, J. Y.; TSAI, C. J.; CHIANG, V. L.; CHEN, Z. Z. *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 675 – 680, 1998.
- HUNTER JÚNIOR, M. L. **Wildlife, Forests and Forestry**: principles of managing forests for biological diversity. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, p. 370, 1990.
- ITO, K.; DOI, Y.; TATEMACHI, Y.; SHIBATA, M. Plant regeneration from rotating nodule cultures. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 42-45, 1996.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw - Hill Book, 1940.
- JOLY, A. B. **Introdução à Taxonomia Vegetal**. São Paulo. Ed. Nacional, 12 ed. p. 504 - 505, 1998.
- KERBAUY, G. B. Competência e determinação em cultura de células e tecidos em plantas. *In*: Torres, A. C.; Caldas, L. S. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v. 2, p. 517 - 519, 1999.
- LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal of *E. grandis*. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 473 – 476, 1994.
- LLOYD, G. B.; McCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of montain (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagation Society**. Boulder, v. 30, p. 421 - 437, 1981.
- MACHADO, L. O.; ANDRADE, G. M.; BARRUETO CID, L. P.; PENCHEL, R. M.; BRASILEIRO, A. C. M. *Agrobacterium* strain specificity and shooty tumour formation in *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 299 – 303, 1997.
- MATHER, A. S. **Global Forest Resources**. Portland: timber. 341 p. 1990.

MOHR, H. *Biologia na atualidade: Estudo dos novos tipos de doenças em florestas (um balancete)*. São Paulo: Fundação Salin Farah Maluf, p. 22, 1987.

MORALEJO, M.; ROCHANGE F.; BOUDET A. M.; TEULIÈRES, C. Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. **Australian Journal Plant Physiology**, v. 25, p. 207 – 212, 1998.

MULLINS, K. V.; LLEWELLYN, D. J.; HARTNEY, V. J.; STRAUSS, S; DENNIS, S. E. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, v.16, p. 787-791, 1997.

MURALIDHARAN, E. M.; MASCARENHAS, A. F. In vitro plantlet formation by organogenesis *Eucalyptus citriodora* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 256 - 259, 1987.

MURASHIGE, R. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473 - 497, 1962.

O' BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v. 59, p. 223 - 228, 1965.

OSSOR, A.; BOXUS, P. Des agglomérats de domes méristématiques – une nouvelle alternative dans la multiplication clonale d' *Eucalyptus camaldulensis*. **Symposium AFOCEL, IUFRO**. França, 14 -18 setembro, 1992.

PARTHIBAN, K. T.; VANANGAMUDI, M.; SURENDRAN, C.; BALAJI, S. *In vitro* propagation of *Eucalyptus tereticornis* Sm. through indirect organogenesis. **Advances in Horticulture and Forestry**, v. 6, p. 179 – 185, 1999.

PARTHIBAN, K. T.; VANANGAMUDI, M.; SURENDRAN, C.; BALAJI, S. Callogenesis and organogenesis in *Eucalyptus tereticornis*. **Journal of Forestry**, v.22, p. 101 – 105, 1999.

PRIYANKU. Induction of callus and rooting in *Eucalyptus globulus*. **Crop Research Hisar**. India, v. 19, p. 315 – 317, 2000.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus* sp. **Acta Horticulture**, Wageningen, v. 78: 437 - 472, 1977.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. Ed. Edgard Blücher, 2 ed p.223 - 245 São Paulo, 1971.

RODRIGUES, A. P. M.; VENDRAME, W. A. Micropropagation of tropical woody species. In: S. Mohan Jain and Kesuaki Ishii. **Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Forestry Sciences. Kluwer Academic Publishers, v. 75, p. 157 - 158, 2003.

SALATI, E. **Reflorestamento e balanço de CO₂**. Rio de Janeiro: FBDS, 1993. 2p. Datilografado.

SILVA, E. **Avaliações quantitativas dos impactos dos reflorestamentos no Brasil**. Viçosa: UFV, 1994. 309p. Tese doutorado.

SILVA, E. Funções ambientais dos reflorestamentos de eucaliptos. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 8, n. 185, p. 5-12, 1996.

SIQUEIRA JÚNIOR, L. **O Trabalho ambiental da Aracruz silvicultura**. Boletim Técnico. São Paulo, v. 12, n. 42, p. 28-31. mar/abr. 1992.

SOUZA, J. A. O potencial da silvicultura na Amazônia. **Revista Silvicultura**, n. 80, 1999. Disponível em: <<http://www.sbc.org.br/revista/revista-celmar.html>> acesso em 12 set. 2001.

STIPP, C. L.; MENDES, B. M. J.; PIEDADE, S. E.; RODRIGUES, A. P. M. *In vitro* morphogenesis of *Cucumis melo* var. *inodorus*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 81 - 89, 2001.

TAKEMORI, N. K.; MARSCHNER, R.; QUOIRIN, M.; BONA, C.; ZANETTE, F. Anatomical study of *Racosperma* (ex-*Acacia*) *mangium* tissues cultured in vitro. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v. 43, p. 51 - 60, 2000.

TIBOK, A.; BLACKHALL, N. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. 1995. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *E. urophylla*. **Plant Science**, v. 110, p. 139 – 145, 1995.

TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. – **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília. Ed. Embrapa –SPI / Embrapa – CNPH, vol 1, p. 1998.

TOURNIER, V.; GRAT, S.; MARQUE, C.; KAYAL, E. W.; PENCHEL, R.; ANDRADE, G.; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). **Transgenic Research**, v. 12, p. 403 - 411, 2003.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. DE M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, p. 44, 2000.

WARRAG, E.; LESLEY, M. S.; ROCKWOOD, P. J. 1990. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 586 – 589, 1991.

WHITE, P.R. A handbook of plant tissue culture. Lancaster Castel, p.273, 1943.

ZIV, M.; SCHWARTZ, A.; FLEMINGER, D. Malfunctioning in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*: implications for hardening. **Plant Science**, v. 52, p. 127 - 134, 1987.

FAO (2001) Global Forest Resources Assessment 2000 – FRA 2000 Main Report – **FAO Forestry Paper** 140, Rome, 479p.

WELANDER M.; WELANDER N. R.; BRACKMAN A. F. Regulation of *in vitro* shoot multiplication in *Malus* by different carbon sources. **Journal Horticulture Science**. V. 64, p. 361 – 366, 1989.

KOINDER M.; KORBAN S. S.; SKIRVIN R. M.; CHU M. C. Influence of embryonic dominance and polarity on adventitious shoot formation from aple cotyledons *in vitro*. **Journal Horticulture Science**. V. 109, p. 381 – 385, 1984.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. E; EICHORN, S.E. *In*: Regulando o crescimento vegetal: Os hormônios vegetais. **Biologia Vegetal**. 6º Ed. Guanabara Koogan. 2001. 780p.